



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster

Título del trabajo:

Estudio del efecto del tipo de forraje y del nivel de proteína bruta sobre los parámetros productivos y el perfil metabolómico en terneros frisones en cebo intensivo

Autora

Sandra Costa Roura

Directores

Dr. Joaquim Balcells Terés

Dr. Daniel Villalba Mata

FACULTAD DE VETERINARIA

2017

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Daniel Villalba y Joaquim Balcells, por estar continuamente planteándome retos y soluciones.

A la Cooperativa d'Ivars d'Urgell, especialmente a Núria Llanes y Eliseu Isla, por poner a nuestra disposición sus instalaciones y medios.

A Gabriel de la Fuente por introducirme en el campo de la metagenómica y a Anna Ñaco y Teresa Giró por su ayuda en el laboratorio.

A Jesús por ser muy buen compañero de despacho, a Xavi por enseñarme a utilizar la estufa y a Pilar por entretenerme siempre con sus historias.

Y a mis padres, por ser valientes e incansables y hacerme querer serlo.

RESUMEN

Los sistemas intensivos de engorde de terneros se enfrentan actualmente a distintos retos. Por un lado, la búsqueda de nuevas fuentes de proteína para la alimentación animal permitiría reducir la dependencia a la soja. Por otro lado, la optimización del nivel de proteína de la ración posibilitaría rebajar la emisión de compuestos contaminantes por los propios animales.

Por todo ello, el presente trabajo tuvo como objetivo principal analizar el impacto, sobre los parámetros productivos y metabólicos, de una reducción en el nivel de proteína bruta de la ración y de un incremento en el aporte de forraje; en terneros frisonos en fase de crecimiento y sometidos a un régimen de cebo intensivo. Para ello, se evaluó la respuesta a una reducción en el aporte de proteína bruta por debajo de los niveles convencionales propuestos por FEDNA (2008) y se estudió la respuesta a un incremento de la ingestión de forraje al mejorar la calidad del mismo, sustituyendo la paja de cebada por un ensilado de gramínea o de leguminosa.

Para llevar a cabo este trabajo, se diseñó una prueba con 80 terneros machos de raza Frisona en período de crecimiento. Los animales se organizaron en cuatro tratamientos experimentales definidos por cuatro raciones distintas, que estaban compuestas por concentrado de baja proteína (10% proteína bruta) y paja de cebada (1-BP) o por concentrado estándar (12% proteína bruta) y uno de los tres siguientes forrajes: paja de cebada (2-CTR), ensilado de avena (3-AV) o ensilado de veza (4-VZ).

El crecimiento y el consumo de concentrado de los animales se registraron de forma automática en granja. Para determinar el consumo de forraje se utilizó un sistema de doble marcado: el óxido de cromo (Cr_2O_3) como marcador externo y las cenizas insolubles en ácido como marcador interno. De esta forma, se detalló el rendimiento productivo de los animales y se calculó la ingestión, excreción y digestibilidad de los distintos nutrientes. A partir de los datos de ingestión y excreción (fecal y urinaria) de nitrógeno se calculó el balance de nitrógeno de los animales. La determinación de la concentración de nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles, así como el pH del líquido ruminal, permitió caracterizar la fermentación ruminal. La secuenciación de regiones variables del ARN ribosómico 16S sirvió para determinar la estructura de la microbiota ruminal de los animales, en términos de poblaciones bacterianas y de arqueas. Se realizó también un recuento de los protozoos del líquido ruminal por lectura en el microscopio óptico. La síntesis de proteína microbiana en el rumen se calculó a partir de la excreción urinaria de derivados púricos. Por último, el impacto del tratamiento experimental sobre el perfil metabólico de los animales se determinó mediante el análisis por cromatografía de líquidos y espectrometría de masas de muestras de orina y plasma.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la reducción del nivel de proteína bruta de la ración penalizó el rendimiento productivo de los animales durante el inicio de la fase de crecimiento, en términos de ganancia media diaria. La restricción proteica disminuyó la ingestión de materia seca, materia orgánica y nitrógeno, sus respectivas tasas de digestibilidad

y también la excreción de nitrógeno vía orina. La retención y deposición proteica no se vieron significativamente afectadas por la menor ingestión de proteína, aunque sí tendieron a disminuir. Al final de la fase de crecimiento (150 días), las diferencias en la ganancia media diaria desaparecieron y se igualó el peso vivo entre los animales adscritos a los dos niveles de ingestión proteica.

La sustitución de la paja de cebada por forrajes de mayor calidad permitió reducir la ingestión global de concentrado de la fase de crecimiento. Al contrario que el ensilado de avena, el empleo de ensilado de veza como forraje penalizó el rendimiento productivo de los animales, por lo que consideramos que el primer forraje es el que tiene una composición que mejor se adapta a su uso combinado con un pienso comercial estándar.

La disminución del nivel de proteína bruta y el incremento de la inclusión de forraje incrementó los niveles de biodiversidad de la microbiota ruminal, por lo que solamente el 34% de las unidades taxonómicas operacionales detectadas fueron comunes en todos los animales e independientes de las condiciones experimentales testadas. La restricción proteica repercutió en un aumento de la abundancia relativa de determinadas poblaciones bacterianas con capacidad para degradar la proteína (*i.e.* *Prevotellaceae* y *Olsenella*), hecho que puede responder a una estrategia de adaptación de la microbiota ruminal a unas condiciones de déficit proteico. La disminución de la ratio forraje/concentrado conseguida mediante la inclusión de ensilado de veza en la ración implicó un aumento de la abundancia relativa de determinadas poblaciones bacterianas implicadas en la degradación de la fibra (*i.e.* *Fibrobacteres* y *Spirochaetes*) y permitió el establecimiento de una población de protozoos en el rumen, así como el aumento de la población de arqueas ruminales.

La restricción proteica alteró el perfil metabolómico de los animales ya que dio lugar a la aparición de nuevos metabolitos, diferenciales entre animales adscritos a los dos niveles de ingestión proteica.

ABSTRACT

Nowadays, beef cattle feedlot fattening faces different challenges. On the one hand, the research on new protein sources for animal nutrition would reduce the system's dependence on soya. On the other hand, the dietary protein level optimization would reduce animals' emission of pollutant compounds.

For these reasons, the aim of this work was to study the impact on productive performance and metabolic profile of a crude protein restriction and a forage intake increase, in growing Holstein calves intensively reared. Firstly, the response of a dietary protein level decrease below the standards proposed by FEDNA (2008) was evaluated. Secondly, the forage intake increase reached by improving its quality was tested.

Eighty Holstein calves in growing period were assigned to four treatments: 1-BP: low protein concentrate (10% crude protein) plus barley straw; 2-CTR: standard concentrate (12% crude protein) plus barley straw; 3-AV: standard concentrate (12% crude protein) plus oat silage and 4-VZ: standard concentrate (12% crude protein) plus vetch silage.

Average daily gain and concentrate intake were automatically registered in farm facilities. A double marker system was used to determine the forage intake: chromium oxide (Cr_2O_3) as external marker and acid insoluble ashes as internal marker. Thus, nutrient intake, excretion and digestibility were calculated. Nitrogen balance was estimated from nitrogen intake and nitrogen urinary and fecal excretions. Rumen fermentation was characterized by determining ammonia nitrogen and volatile fatty acid concentrations and pH. Rumen bacterial and archaeal community composition was analyzed by taxonomic profiling of 16S ribosomal RNA variable regions. Ruminal protozoa cells were counted using an optical microscope. Microbial protein synthesis in rumen was calculated from purine derivatives urinary excretion. Finally, metabolic profile was determined from urine and plasma samples by liquid chromatography coupled with mass spectrometry.

The results showed that, at the beginning of the growing phase, crude protein restriction reduced average daily gain. Dry matter, organic matter and nitrogen intakes were reduced, and also their apparent digestibility. Nitrogen urinary loss was lessened and nitrogen retention and accretion remained unchanged but tended to be lower. At the end of the growing phase, differences in animals' productive performance disappeared and calves' body weights became equal between treatments.

The replacement of barley straw for high quality forages reduced concentrate intake of the whole growing phase. Productive performance of calves eating vetch silage was lessened, but not the one of those calves eating oat silage. For this reason, we considered oat silage as the best forage to use in combination with a standard commercial concentrate.

Both crude protein restriction and forage intake increase raised rumen microbial biodiversity levels, thus only 34% of detected operational taxonomic units were common between animals and experimental treatments. Dietary protein restriction led to an increase in proteolytic bacterial communities (i.e. *Prevotellaceae* and *Olsenella*), which may constitute a rumen microbiome strategy to cope with protein shortage. Forage intake increase achieved in animals consuming vetch silage led to an increase in fibrolytic bacterial communities (i.e. *Fibrobacteres* and *Spirochaetes*) and in ruminal archaeal population. Moreover, inclusion of vetch silage in calves' diet allowed protozoal community to establish in rumen.

New metabolites, which were discriminant between experimental treatments, became present because of crude protein restriction.

RÉSUMÉ

Les systèmes intensifs d'élevage de veaux aujourd'hui font face à différents défis. D'un côté, la recherche de nouvelles sources de protéine pour la nourriture des animaux vont réduire la dépendance du soja. De l'autre, l'optimisation du niveau de protéine ferait possible réduire l'émission des composants polluants par les animaux.

C'est par tout ça que le présent document a comme objectif principal l'analyse de l'incidence sur les paramètres productifs et métaboliques, d'une réduction du niveau total de protéine par ration et de l'augmentation du fourrage, ceci dans les veaux Holstein soumis à systèmes d'élevage intensif. C'est pourquoi on a évalué la réponse à une réduction de protéine brute en dessous des niveaux conventionnels que propose le FEDNA (2008) et on étudié la réponse à l'augmentation de l'apport de fourrage quand on améliore sa qualité, en substituant la paille d'orge par un ensilage de graminée ou de légumineuse.

Pour aboutir ce travail on a fait épreuve à 80 veaux de race Frisonne en étape de croissance. Les animaux ont été séparés par quatre traitements expérimentaux définis par quatre différentes rations, toutes composées par concentré de protéine basse (10% protéine brute) et paille d'orge (1-BP) ou pour concentré standard (12% protéine brute) et des aliments suivants: paille d'orge (2-CTR), ensilage d'avoine (3-AV) ou ensilage de vesce (4-VC).

On a enregistré de forme automatique à la ferme la croissance et la consommation de concentrés par les animaux. Pour déterminer la consommation de fourrage on a utilisé un système de double marquage: l'Oxyde de Chrome (Cr_2O_3) comme marqueur externe et les cendres insolubles dans acide comme marqueur interne. Ainsi on a détaillé le rendement productif des animaux et on a calculé l'ingestion, l'excrétion et la digestibilité des différents nutriments. D'après les données d'ingestion et excrétion (fécal et urinaire) de nitrogène on a calculé le bilan de nitrogène des animaux. La détermination de la concentration de nitrogène ammoniacal et des acides gras volatiles, autant que le pH du liquide du rumen on possibilité de caractériser la fermentation ruminale. Le séquençage de régions variables du l'ARN ribosomal 16S a été utilisé pour déterminer la structure du microbiote des animaux, par des populations de bactéries et archées. On a réalisé aussi un comptage de protozoaires du liquide ruminale par lecture avec le microscope optique. La synthèse de protéine microbienne dans le rumen a été calculée d'après l'excrétion urinaire des dérivés de purine. Enfin, l'incidence du traitement expérimental sur le profil métabolique des animaux a été déterminée par chromatographie de liquides et spectrométrie de masse d'échantillons d'urine et de plasma.

Les résultats obtenus montrent que la réduction du niveau de protéine brute de la ration pendant le premier période de la phase de croissance a fait diminuer les rendements productifs des animaux respectes le gain moyen quotidien. La restriction protéique a fait aussi diminuer l'apport de matière sèche, matière organique et nitrogène, ses tasses de digestibilité et l'excrétion de nitrogène via urine. La rétention et l'accumulation protéiques n'ont pas été

modifiées mais ont eu tendance à diminuer. À la fin de la phase de croissance, les différences dans le rythme productif sont disparues et s'est égalé le poids vif des animaux rattachés dans les deux niveaux d'apport protéique.

La substitution de la paille d'orge par des fourrages de meilleure qualité a fait réduire l'apport globale de concentré dans la phase de croissance. Au contraire du ensilé d'avoine, l'ensilé de vesce comme fourrage a fait diminuer les rendements productifs des animaux, c'est pour ça que nous considérons que le premier fourrage est celui qui est mieux adapté à l'utilisation combinée avec les aliments commerciaux standard.

La diminution du niveau de protéine brute et l'augmentation de l'apport de fourrage sont revenues à augmenter la biodiversité de microbiote ruminale, c'est pour ça que seulement le 34% des unités taxonomiques opérationnelles détectés ont été communs dans tous les animaux de forme indépendante des conditions expérimentales testées. La restriction protéique est revenue en l'augmentation relative de populations bactériennes déterminées avec l'aptitude de dégrader la protéine (i.e. *Prevotellaceae* et *Olsenella*), fait qui peut répondre à une stratégie d'adaptation du microbiote ruminale à des conditions de déficit protéique. La diminution de la ratio fourrage/concentré obtenu avec l'inclusion d'ensilé de vesce dans la ration a impliqué une augmentation de l'abondance relative de populations bactériennes déterminées qui participent dans la dégradation de la fibre (i.e. *Fibrobacteres* et *Spirochaetes*) et aussi la population d'archées ruminales. De plus, la utilisation de l'ensilé de vesce a permis l'établissement d'une population de protozoaires ruminales.

La restriction protéique a changé le profil métabolomique des animaux parce qu'il a fait apparaître nouveaux métabolites à l'écart entre animaux rattachés aux deux niveaux d'ingestion protéique.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
II.1 Anatomía y fisiología de la digestión.....	5
II.2 Ecosistema del rumen.....	6
II.3 Avances metodológicos en el estudio de la microbiota ruminal	8
II.3.1 Caracterización de la microbiota ruminal	8
II.3.2 Cuantificación de la síntesis o producción microbiana en el rumen	9
II.4 Degradación microbiana de los hidratos de carbono.....	11
II.4.1 Estructura de los hidratos de carbono	11
II.4.2 Fermentación de los hidratos de carbono en el rumen.....	12
II.5 Degradación microbiana de las proteínas.....	14
II.5.1 Estructura de los aminoácidos y de las proteínas	14
II.5.2 Fermentación de la proteína en el rumen	15
II.6 Productos finales de la fermentación ruminal	17
II.6.1 Ácidos grasos volátiles.....	17
II.6.2 Masa microbiana	18
II.6.3 Gases	19
II.7 Metabolismo proteico en el animal rumiante.....	20
II.8 Avances metodológicos en el estudio del metabolismo	20
III. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	25
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
IV.1 Animales y localización.....	27
IV.2 Diseño experimental	27
IV.3 Procedimiento experimental	29
IV.4 Procedimiento de muestreo y conservación de las muestras	31
IV.4.1 Alimentos y heces.....	31
IV.4.2 Líquido ruminal	31
IV.4.3 Sangre.....	32
IV.4.4 Orina	33
IV.5 Métodos analíticos empleados	33
IV.5.1 Principios inmediatos en alimentos, heces y orina	33
IV.5.2 Marcadores interno y externo en alimentos y heces	34
IV.5.3 Ácidos grasos volátiles en líquido ruminal.....	35

IV.5.4 Nitrógeno amoniacal en líquido ruminal	35
IV.5.5 Recuento de protozoos en líquido ruminal	36
IV.5.6 Metagenoma: poblaciones bacterianas y de arqueas en líquido ruminal	36
IV.5.7 Metabolitos y proteínas totales en plasma	38
IV.5.8 Urea, creatinina y derivados púricos en orina	39
IV.5.9 Perfil metabolómico en plasma y en orina	39
IV.6 Cálculos y análisis estadístico	40
IV.6.1 Digestibilidad, balance de nitrógeno y síntesis de proteína microbiana.....	40
IV.6.2 Metagenoma	43
IV.6.3 Metaboloma	45
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
V.1 Ingestión y ganancia media diaria durante el período de crecimiento	47
V.2 Digestibilidad, parámetros ruminales, balance de nitrógeno y síntesis de proteína microbiana	49
V.2.1 Ingestión, excreción y digestibilidad aparente de las raciones.....	49
V.2.2 Concentración ruminal de amoníaco y ácidos grasos volátiles.....	53
V.2.3 Balance de nitrógeno	56
V.2.4 Concentraciones plasmática y urinaria y cinética de excreción renal de urea y creatinina	57
V.2.6 Síntesis de proteína microbiana en el rumen: excreción urinaria de derivados púricos	60
V.3 Metagenoma	62
V.3.1 Análisis de los resultados de secuenciación del ARN ribosómico	62
V.3.2 Comparación de la microbiota ruminal entre tratamientos	62
V.3.3 Análisis de las diferencias de la microbiota ruminal entre tratamientos	67
V.3.4 Relación entre microbiota ruminal y tratamiento experimental.....	71
V.4 Metaboloma	75
VI. CONCLUSIONES	81
VII. REFERENCIAS	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Resumen de distintos trabajos de metabolómica no dirigida. Se presenta el tipo de animal, el objetivo del trabajo, la técnica experimental y el tipo de muestra empleada.	23
Tabla 2 Composición en ingredientes, química y en nutrientes de los dos concentrados utilizados en la prueba experimental.	28
Tabla 3 Composición química y en nutrientes de los tres forrajes utilizados en la prueba experimental.....	29
Tabla 4 Condiciones cromatográficas en las que se realizó el análisis de la concentración de ácidos grasos volátiles en líquido ruminal.	35
Tabla 5 Condiciones de la elución en gradiente empleada para la separación de los analitos por cromatografía de líquidos de ultra resolución en la determinación de urea, creatinina y derivados púricos en orina.	39
Tabla 6 Condiciones de la elución en gradiente empleada para la separación de los analitos por cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución en la determinación del perfil metabolómico en orina y plasma.	40
Tabla 7 Ingestión media de concentrado y ganancia media diaria por tratamiento y período en terneros frisonos en fase de crecimiento (de 167 a 409.5 kg de peso vivo y de 122 a 272 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ). Se presentan también los errores estándar y la significación del efecto tratamiento.	47
Tabla 8 Valores medios de ingestión, excreción fecal y digestibilidad aparente por tratamiento obtenidos en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ). Se presentan también los errores estándar y la significación del efecto tratamiento.	50
Tabla 9 Concentración de nitrógeno amoniacal, concentración y proporción de ácidos grasos volátiles y nivel de acidez ruminal por tratamiento obtenidos en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ). Se presentan también los errores estándar y la significación del efecto tratamiento.	53

- Tabla 10** Balance y deposición de N por tratamiento obtenidos en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ). Se presentan también los errores estándar y la significación del efecto tratamiento. 56
- Tabla 11** Concentración plasmática y urinaria de urea y creatinina y cinética de excreción renal por tratamiento obtenidas en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ). Se presentan también los errores estándar y la significación del efecto tratamiento. 58
- Tabla 12** Excreción urinaria de creatinina y derivados púricos y síntesis de nitrógeno microbiano en el rumen por tratamiento obtenidas en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ). Se presentan también los errores estándar y la significación del efecto tratamiento. 60
- Tabla 13** Abundancia relativa (%) de los siete filos principales y de las arqueas y parámetros de valoración de la diversidad microbiana por tratamiento obtenidos en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ). Se presentan también los errores estándar y la significación del efecto tratamiento. 69
- Tabla 14** Suma de los metabolitos detectados en los tratamientos 1-BP y 2-CTR y suma de los metabolitos clasificados como diferenciales entre los tratamientos 1-BP y 2-CTR mediante un test de Wilcoxon obtenidos en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR). 75

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Asignación taxonómica por el paradigma del ancestro común más bajo o LCA. Las letras A, B, C y D representan los cuatro mejores alineamientos de la secuencia problema obtenidos por BLAST. El taxón marcado con una estrella sería el finalmente asignado a la secuencia problema porque es el ancestro común más bajo que engloba los cuatro mejores alineamientos. Fuente: Bio4j..... 38
- Figura 2** Diagrama de Venn que muestra los OTUs específicos de cada tratamiento experimental, así como los comunes en distintos tratamientos. Obtenido en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ)..... 63
- Figura 3** Representación gráfica del análisis de coordenadas principales (PCoA). Obtenido en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ). 63
- Figura 4** Representación gráfica del análisis de conglomerados en forma de dendrograma. Obtenido en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ). 64
- Figura 5** Representación gráfica del análisis canónico de correspondencias (CCA). Obtenido en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ)..... 66
- Figura 6** Representación gráfica del análisis de similitud (ANOSIM). Obtenido en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ)..... 68

- Figura 7** Representación gráfica de la concentración relativa (%) de los cuatro filos más abundantes por tratamiento experimental. Se representan los 10 animales por tratamiento experimental que fueron muestreados en el estudio. Obtenido en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ)..... 70
- Figura 8** Representación gráfica del análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLSDA) realizado en base al total de metabolitos detectados en orina por ionización negativa (A) y positiva (B). Obtenido en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR)..... 76
- Figura 9** Representación gráfica del análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLSDA) realizado en base al total de metabolitos detectados en plasma por ionización negativa (A) y positiva (B). Obtenido en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR). 77
- Figura 10** Mapa térmico de los 25 metabolitos más diferenciales hallados en orina por ionización negativa (A) y positiva (B). Obtenido en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR). 78
- Figura 11** Mapa térmico de los 25 metabolitos más diferenciales hallados en plasma por ionización negativa (A) y positiva (B). Obtenido en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR). 79

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxiribonucleico
AGV:	Ácidos grasos volátiles
ANOSIM:	<i>Analysis of Similarities</i>
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNr:	Ácido ribonucleico ribosómico
BLAST:	<i>Basic local alignment search tool</i>
C:	Carbono
CCA:	<i>Canonical Correspondance Analysis</i>
CH ₄ :	Metano
CIA:	Cenizas insolubles en ácido
CO ₂ :	Dióxido de carbono
Cr ₂ O ₃ :	Óxido de cromo
DP:	Derivados púricos
EE:	Extracto etéreo
ee:	Error estándar
FAD:	Fibra ácido detergente
FLASH:	<i>Fast length adjustment of short reads</i>
FND:	Fibra neutro detergente
GMD:	Ganancia media diaria
H:	Hidrógeno
H ₂ :	Gas hidrógeno
H ₂ O:	Agua
LCA:	<i>Lowest Common Ancestor</i>
MF:	Materia fresca
MO:	Materia orgánica
MOD:	Materia orgánica digestible
MODR:	Materia orgánica digestible en el rumen
MS:	Materia seca

MSEA:	<i>Metabolite Set Enrichment Analysis</i>
N:	Nitrógeno
N ₂ :	Nitrógeno molecular
N-NH ₃ :	Nitrógeno amoniacal
NCBI:	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND:	Nitrógeno digestible
NH ₃ :	Amoníaco
NM:	Nitrógeno microbiano
N ₂ O:	Óxido nitroso
NO _x :	Óxidos de nitrógeno
OTU:	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
P:	Fósforo
PB:	Proteína bruta
PCoA:	<i>Principal Coordinate Analysis</i>
PCR:	<i>Polymerase chain reaction</i>
PLSDA:	<i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
PV:	Peso vivo
TFG:	Tasa de filtración glomerular

I. INTRODUCCIÓN

La producción de carne de vacuno representa el 6% de la Producción Final Agraria de España y, dentro de las producciones ganaderas, es el cuarto sector en importancia económica por detrás del porcino, del lácteo y del avícola, representando en 2016 aproximadamente el 17% de la Producción Final Ganadera. Su valor de mercado superó en 2016 los 2,700 millones de euros con más de 2 millones de cabezas sacrificadas (MAPAMA, 2016).

El engorde de terneros en España se da mayoritariamente en un sistema de producción intensivo, puesto en marcha en los años sesenta con el objetivo de incrementar la eficiencia y ritmo de producción y con ello satisfacer el aumento de la demanda. La alimentación de los terneros en dicho sistema se basa en la utilización de concentrado *ad libitum*, compuesto básicamente por grano de cereal y harina de oleaginosas, más un aporte minoritario de paja de cereal como constituyente fibroso (entorno al 10%), también administrada *ad libitum*.

Los sistemas ganaderos intensivos y altamente especializados, como lo es el engorde de terneros, se enfrentan actualmente a diversos retos (Dumont *et al.*, 2014), entre los que destacan minimizar su impacto ambiental, reducir la competencia por alimentos de posible consumo humano y aumentar su autosuficiencia.

Cabe señalar que la utilización de raciones compuestas por una elevada proporción de concentrado (>80%) da lugar a procesos de fermentación tan activos que se incrementa de forma manifiesta la producción de ácidos grasos volátiles (AGV; acético, propiónico y butírico), con lo que desciende el pH ruminal. Aunque dicho descenso puede ser parcialmente compensado por un incremento en su absorción (el pK de los AGV mayoritarios es favorable), ello no sucede con el ácido láctico, cuyo acúmulo sitúa el ambiente ruminal en una situación de acidosis latente con la consecuente aparición de ciertas disbiosis en los procesos de fermentación, como lo son la acidosis láctica o sistémica y el timpanismo (Beauchemin y Buchanan-Smith, 1990). Esta situación se mantuvo un tiempo limitando el crecimiento microbiano mediante la administración de sustancias antibióticas en la ración (i.e. ionóforos); no obstante, la Unión Europea prohibió totalmente (Reglamento (CE) 1831/2003) la utilización de dichos productos por razones medioambientales e higiénicas a partir de 2006. La prohibición del uso de antibióticos en el engorde de terneros ha incrementado la incidencia de acidosis ruminales y por ello el sector debe buscar alternativas para minimizar o evitar esta problemática.

(1) La búsqueda de nuevas fuentes proteicas para la alimentación animal, (2) la optimización del nivel de proteína en la ración y (3) la adopción de sistemas alternativos de engorde de terneros constituyen tres vías en desarrollo para abordar los retos y problemáticas ya mencionados.

1) Búsqueda de nuevas fuentes de proteína para la alimentación animal

Europa es dependiente de las importaciones de materias primas que componen las raciones concentradas (i.e. soja y maíz), lo que hace a estos sistemas dependientes de la volatilidad de los precios. Es especialmente destacable el déficit proteico: hasta el 52% de la proteína consumida por el ganado procede de soja importada (Peyraud *et al.*, 2014). Además de la dependencia comercial, el cultivo masivo de soja tiene implicaciones sociales y ambientales (huella de carbono, huella hídrica, cambios en el uso de la tierra, etc.) en los países de origen (Henriksson *et al.*, 2014; Sasu-Boakye *et al.*, 2014) y también en los de destino (Steen-Olsen *et al.*, 2012), además de tratarse de un producto modificado genéticamente que puede generar un rechazo social (Krimpen *et al.*, 2013). Por ello, hay un creciente interés por la búsqueda de fuentes proteicas alternativas de origen local para la alimentación animal.

En rumiantes, se han valorado diversas posibilidades de uso de fuentes proteicas locales (Wilkins y Jones, 2000; Henriksson *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2016), entre las que destacan las leguminosas. Dichas especies mejoran la fertilidad del suelo (al ser capaces de fijar nitrógeno [N] inorgánico) y el valor nutritivo del forraje (al constituir una fuente de proteína y energía de elevada digestibilidad) (Marten *et al.*, 1989; Frame *et al.*, 1998 en Phelan *et al.*, 2015). Esta alternativa se entronca con el Reglamento (UE) 1307/2013 que modificó el pago directo de las ayudas a los agricultores en el marco de la Política Agraria Común que promueve el cultivo de leguminosas.

Las leguminosas forrajeras pertenecen a la familia *Fabaceae* cuya planta, y no solamente su semilla, puede ser utilizada para la alimentación de rumiantes (Barnes *et al.*, 1995; Graham y Vance, 2003 en Phelan *et al.*, 2015). Pueden ser producidas en monocultivos o cultivos mixtos con otras especies (generalmente gramíneas) y son aprovechadas en forma de pasto, ensilado o heno (Phelan *et al.*, 2015). Aunque solo unas pocas variedades son de interés comercial a nivel global (*Medicago sativa*, *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*, *Trifolium subterraneum*, *Lotus corniculatus*), se estima que existen entre 16,000 y 17,000 especies de leguminosas en total (Phelan *et al.*, 2015). Su uso en la alimentación de rumiantes está siendo estudiado mediante los diferentes tipos de metodologías disponibles: *in vitro* (Soltan *et al.*, 2012), *in situ* (Demirel *et al.*, 2003; Coblenz y Grabber, 2013) e *in vivo* (Thomson *et al.*, 1992; Molle *et al.*, 2008).

2) Optimización del nivel proteico de la ración

A nivel ambiental la producción de rumiantes es considerada una fuente de contaminación, tanto por la emisión de gases de efecto invernadero (metano [CH₄] y óxidos de nitrógeno [NO_x]), como por la eutrofización de agua y suelo debida a la excreción de N y fósforo (P). El CH₄ se produce principalmente durante la fermentación digestiva pero también por la descomposición de los compuestos carbonados en el estiércol. El P y el N no digeridos se excretan en las heces, mientras que los productos del metabolismo del N son excretados vía

urinaria, siendo dicha fracción más susceptible de transformarse y ser emitida en forma de amoníaco (NH₃) u óxido nitroso (N₂O) (McDonald *et al.*, 2010).

La excreción de N se relaciona con diversos aspectos: un exceso de proteína en la ración (Sinclair *et al.*, 2014), la utilización ineficiente del N en el rumen (Hristov *et al.*, 2011); y la subestimación del proceso de reciclaje ruminal de urea (Galles *et al.*, 2011). Por ello, los estudios de optimización del uso del N en vacuno de carne se basan, entre otras opciones, en optimizar/reducir el nivel de proteína de la ración. Trabajos realizados con raciones concentradas en las que se ha reducido el contenido proteico de la ración, en todo o sólo en parte del ciclo de engorde, han registrado los mismos índices productivos pero con una menor excreción de N urinario (Erickson y Klopfenstein, 2001). En la misma línea y a nivel estatal, en cebo intensivo de terneros recibiendo pienso y paja de cereal *ad libitum*, Devant *et al.* (2000) confirman que existe un margen de reducción de los niveles de proteína de las raciones sin alterar el nivel de productividad o eficiencia del sistema. Resultados preliminares basados en el estudio de las concentraciones de urea plasmática (Costa *et al.*, 2017) indican que es frecuente en las raciones comerciales encontrar un exceso de proteína, especialmente en animales en fase de cebo.

3) Sistemas de engorde alternativos

Dada la problemática ligada a los sistemas convencionales de cebo intensivo basados en raciones concentradas, actualmente se plantean sistemas alternativos basados en un mayor aporte de forraje. Un incremento en el aporte de forraje permitiría mejorar las condiciones de fermentación y, a su vez, maximizar la utilización de forrajes producidos localmente reduciendo así los costes de la ración. No obstante, también existen razones sociales y ambientales. A nivel social, la utilización de cereales para la alimentación del ganado entra en competencia con el consumo humano, lo que desata las críticas de algunos sectores de la sociedad. A nivel ambiental, el uso de raciones concentradas en rumiantes supone desaprovechar la capacidad del animal rumiante de utilizar alimentos fibrosos que en muchos casos no pueden ser aprovechados de otra forma.

A pesar de las ventajas que implica la utilización de dietas forrajeras en el cebo de terneros, la inclusión de mayores proporciones de forraje en la ración suele tener una relación negativa con el rendimiento productivo de los animales, que se traduce en una menor ganancia media diaria (GMD) (Calderon-Cortes y Zinn, 1996; Salinas-Chavira *et al.*, 2013; Swanson *et al.*, 2017).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA DIGESTIÓN

La dentadura de los animales rumiantes se caracteriza porque carece de incisivos superiores y caninos y porque los molares, grandes y rugosos, están colocados de forma que impiden la masticación simultánea del alimento por ambos lados de la mandíbula. De este modo, la masticación en los rumiantes se realiza mediante movimientos laterales de la mandíbula que permiten el desmenuzamiento de las fibras vegetales de los alimentos (Church y Pond, 1977).

La abundante producción de saliva en los rumiantes (150 L/día en vacas y 10 L/día en ovejas [Church y Pond, 1977]) es clave para tamponar el pH del contenido ruminal, manteniéndolo alrededor de 5.5-6.5 (McDonald *et al.*, 2010).

Los rumiantes domésticos disponen de un estómago policavitario con cuatro compartimentos: rumen (dividido en saco dorsal y saco ventral, ocupa la totalidad de la mitad izquierda de la cavidad abdominal), retículo (en posición craneal), omaso y abomaso (alojados en la mitad derecha de la cavidad abdominal). El rumen y el retículo forman una cavidad común (sólo el pliegue rumino-reticular separa las dos cavidades) que representa el 80% del volumen del estómago policavitario completo y en la que los alimentos son sometidos a una fermentación microbiana. En el omaso, conectado con el retículo-rumen a través del orificio retículo-omasal, tiene lugar la reabsorción de agua del bolo alimenticio. El abomaso es el único compartimento que dispone de mucosa glandular, por lo que en él se inicia la digestión enzimática de los alimentos (König y Liebich, 2011).

Los fenómenos de peristaltismo ruminal permiten mantener unas óptimas condiciones de fermentación. Se han descrito dos patrones de motilidad en el retículo-rumen: (1) principal o de contracciones de mezclado y (2) secundario o de contracciones de eructación. Las contracciones de mezclado se inician con una contracción doble del retículo, seguida de distintas contracciones peristálticas de los sacos dorsal y ventral del rumen, primero en dirección caudal y después craneal. Este patrón de movimientos facilita el mezclado de la ingesta y ayuda a la separación de las partículas grandes y pequeñas. Las contracciones de eructación, que se dan de forma consecutiva a las contracciones de mezclado, comienzan en la parte más caudal del saco dorsal y se desplazan en dirección craneal. Su función es empujar el gas (principalmente dióxido de carbono [CO₂] y CH₄ producidos en los procesos de fermentación microbiana en el retículo-rumen) hacia la parte craneal del rumen para que pueda ser expulsado vía cardias. La frecuencia e intensidad de las contracciones del retículo-rumen son mayores en animales alimentados con raciones fibrosas (Cunningham, 2003).

El contenido ruminal está estratificado a causa de los efectos de la gravedad y de la motilidad retículo-ruminal. En la parte más dorsal del rumen, se acumulan los gases producidos durante la fermentación microbiana. Justo debajo de la capa de gas, se encuentra la zona sólida,

formada por partículas de forraje entrelazadas que se mantienen a flote por el aire atrapado entre ellas y por las burbujas de gases de fermentación. En la parte más ventral del rumen se halla la zona líquida y, justo por encima de ésta y por debajo de la sólida, se extiende la zona pastosa. Después de la deglución, el alimento ingerido queda atrapado en la zona sólida. A medida que avanza la fermentación, el tamaño de las partículas disminuye y el aire atrapado se dispersa, por lo que las partículas de alimento descienden hacia la zona pastosa. Los patrones de motilidad del retículo-rumen provocan, por un lado, una corriente circular en sentido antihorario en la zona sólida (que permite albergar más partículas groseras de alimento en la parte craneal) y, por otro lado, una corriente circular en sentido horario en la zona pastosa (que permite que las partículas groseras vuelvan a la zona sólida y las de tamaño pequeño salgan hacia omaso y abomaso por el orificio retículoomasal) (Cunningham, 2003).

La rumia (o acto de remasticar la ingesta del rumen) interviene en la reducción del tamaño de las partículas de alimento. La regurgitación que precede la rumia tiene lugar justo antes de iniciarse un ciclo de contracciones de mezclado y, en el momento que el bolo alimenticio alcanza la cavidad oral, la lengua extrae el exceso de agua (que vuelve a ser deglutido) y empieza la remasticación. La rumia, además de intervenir en la separación de partículas (el agua y las partículas pequeñas se tragan antes que el material remasticado), intensifica la fermentación microbiana al fraccionar las partículas de alimento y dejar en exposición sustrato fermentable no accesible previamente (Cunningham, 2003).

II.2 ECOSISTEMA DEL RUMEN

La microbiota ruminal mantiene una relación simbiótica con el huésped: depende del animal rumiante para disponer de sustratos nutritivos y de las condiciones óptimas para su crecimiento y, a su vez, posibilita la degradación de los alimentos fibrosos que, de otra forma, serían totalmente inasimilables por el sistema digestivo de los animales superiores (Church, 1993).

Para que el ambiente ruminal sea el propicio para el desarrollo de una población microbiana, deben cumplirse los siguientes requisitos recogidos por Cunningham (2003):

- 1) Aporte de sustrato para la fermentación.
- 2) Mantenimiento de la temperatura entre los 37-39°C.
- 3) Mantenimiento de la carga iónica cerca de los 250-300 mOsm/kg.
- 4) Mantenimiento de un potencial redox negativo (entre -400 - -250 mV), que se consigue manteniendo en anaerobiosis los lugares de fermentación.
- 5) Eliminación de los residuos indigestibles.
- 6) Ritmo de eliminación de los microorganismos compatible con sus tiempos de regeneración.
- 7) Eliminación de los residuos ácidos de la fermentación y amortiguación del pH ruminal.

El aporte de sustrato para la fermentación se garantiza mediante la ingestión de alimento por parte del animal. El mantenimiento de la temperatura y osmolalidad óptimas se consigue gracias a los mismos mecanismos homeostáticos que regulan la temperatura corporal del

huésped. La eliminación de oxígeno del retículo-rumen permite mantener negativo el potencial redox. Los fenómenos de motilidad ruminal y la estratificación del rumen permiten la eliminación de residuos indigestibles y masa microbiana. Por último, la absorción directa de ácidos grasos de cadena corta y la producción de saliva evitan una bajada excesiva del pH ruminal.

La microbiota ruminal está formada por microorganismos procariotas (bacterias y arqueas metanogénicas), protozoos y hongos a unas concentraciones de 10^{10} , 10^6 y 10^4 células/mL (Castillo-González *et al.*, 2014).

Las bacterias constituyen la mayor parte de la microbiota ruminal. Existe una gran cantidad de poblaciones bacterianas que difieren entre sí por la capacidad de degradar ciertos sustratos, por los requerimientos de energía para su mantenimiento y por su resistencia a la toxicidad de determinados productos metabólicos, entre otros factores (Russell *et al.*, 1979 en Castillo-González, 2014). A pesar de la gran diversidad de especies bacterianas, la mayoría de ellas son anaerobias estrictas (Church, 1993).

Las poblaciones de arqueas metanogénicas representan menos del 3% del total de microorganismos procariotas del rumen y, en contraposición a la gran diversidad de especies bacterianas, el 93% de las arqueas ruminales pertenecen a sólo tres géneros taxonómicos: *Methanobrevibacter*, *Methanococcus* y *Methanospirillum* (Paul *et al.*, 2012 en Belanche *et al.*, 2014). Se estima que el 9-25% de las arqueas ruminales (Newbold *et al.*, 1995 en Belanche *et al.*, 2014) vive en simbiosis con los protozoos ruminales: los protozoos producen grandes cantidades de gas hidrógeno (H_2) en sus reacciones de oxidación que las arqueas captan y utilizan para sus reacciones de metanogénesis.

Aunque los protozoos se encuentran en menor concentración en el rumen que los procariotas, se calcula que pueden representar hasta el 2% del peso del contenido ruminal y el 40% del N microbiano (Church, 1993). Los protozoos del rumen pueden ser divididos en dos grandes grupos: holótricos (células ovoides cubiertas de cilios, los principales géneros son *Isotricha* y *Dasytricha*) y entodiniomórfidos (presentan cilios solamente en una región de la célula, las principales subfamilias son *Entodiniinae*, *Diplodiniinae* y *Ophryoscolecinae*) (Williams y Coleman, 1992 en Belanche *et al.*, 2014). De metabolismo anaerobio estricto, son sensibles a pH ruminales inferiores a 6 (Towne y Nagaraja, 1990 en Belanche, 2008) y satisfacen sus necesidades de N mediante la depredación de bacterias y otras células protozoarias de menor tamaño (Hobson y Stewart, 1997 en Belanche, 2012).

Aunque menos estudiados que el resto de la microbiota, se sabe que los hongos ruminales son anaerobios estrictos y que su ciclo de vida incluye una fase móvil (zoosporas) y una fase vegetativa (esporangios) que coloniza partículas de alimento mediante sus rizoides. En el rumen, se han identificado y clasificado hongos pertenecientes a los géneros *Neocalimatrix*, *Sphaeromonas*, *Piromonas*, *Caecomyces* y *Orpinomyces* (Van Soest, 1994). Todos estrictamente anaerobios, utilizan la proteína degradable del rumen como fuente de N (Hobson

y Stewart, 1997 en Belanche, 2012) y, al igual que los protozoos, su concentración está directamente relacionada con el pH ruminal (Belanche *et al.*, 2012; Mickdam *et al.*, 2016).

Cabe destacar que los protozoos y hongos ruminales tienen tiempos de generación (>12 horas) que superan la tasa de renovación ruminal, por lo que su permanencia en el rumen está sujeta a su capacidad de adhesión a las partículas y, por tanto, el tamaño de partícula del alimento influye en su concentración (Ørskov y Ryle, 1990 en Belanche, 2008).

II.3 AVANCES METODOLÓGICOS EN EL ESTUDIO DE LA MICROBIOTA RUMINAL

II.3.1 Caracterización de la microbiota ruminal

Los métodos convencionales de estudio de la microbiota ruminal se han basado en el aislamiento y cultivo de las poblaciones microbianas. No obstante, el desarrollo de dichos métodos se ha visto limitado por distintos factores, entre los cuales destacan: las diferencias en los medios de cultivo, los procedimientos de aislamiento, la composición de la atmosfera del medio de cultivo y los marcadores fenotípicos utilizados para la clasificación de las distintas poblaciones microbianas (Kocherginskaya *et al.*, 2001). Todo ello ha impedido la estandarización de una técnica de cultivo válida que proporcionase resultados comparables entre distintos laboratorios y no se descarta la posibilidad de que el estudio realizado hasta ahora se haya centrado sólo en aquellas poblaciones capaces de desarrollarse *in vitro*.

Los avances en el campo de la ecología microbiana del rumen han permitido el desarrollo de técnicas de biología molecular para caracterizar, amplificar y secuenciar el material genético ruminal, eliminando así las limitaciones impuestas por las técnicas de aislamiento y cultivo ya descritas (Kocherginskaya *et al.*, 2001).

Según Henderson *et al.* (2013) dichos procedimientos consisten en:

- 1) Muestreo del contenido ruminal.
- 2) Extracción del ácido desoxiribonucleico (ADN) de la muestra.
- 3) Identificación y amplificación de los genes específicos utilizados como marcadores genéticos de las poblaciones microbianas: los genes que codifican el ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 16S para bacterias y arqueas, los genes que codifican el ARNr 18S para protozoos y el espaciador interno transcrito 1 para los hongos.
- 4) Secuenciación de los amplicones.

Una vez obtenida la secuencia del material genético de la muestra, se contrasta con una base de datos con el objetivo de identificar las distintas poblaciones microbianas comparando la secuencia obtenida con bancos de genes registrados previamente en dichas bases (Fernández *et al.*, 2010).

Aunque las técnicas de biología molecular también presentan algunas limitaciones (i.e. referentes al método de extracción de ADN [Henderson *et al.*; 2013]), son más específicas y capaces de detectar todas las poblaciones microbianas de la muestra y no sólo las que tengan capacidad de crecer *in vitro*.

II.3.2 Cuantificación de la síntesis o producción microbiana en el rumen

Convencionalmente, el crecimiento de la microbiota ruminal se ha cuantificado mediante técnicas *in vivo* que requieren del uso de marcadores microbianos y animales canulados en el rumen y duodeno.

Dichas técnicas, se resumen en (Carro, 2001):

- 1) Determinación del flujo duodenal de N no amoniacal.
- 2) Determinación de la ratio marcador/N en la digesta duodenal.
- 3) Determinación de la ratio marcador/N en los microorganismos.
- 4) Determinación de la proporción de N microbiano en el N duodenal a partir del cociente entre las dos ratios anteriores.

Sabiendo la proporción de N de los microorganismos y el N microbiano en la digesta duodenal, se puede establecer la masa microbiana que abandona el retículo-rumen.

Aunque ampliamente utilizadas, dichas técnicas presentan una serie de limitaciones (Carro, 2001). En primer lugar, la determinación del flujo duodenal requiere, o bien utilizar una cánula reentrante (de difícil implantación, suele afectar a la innervación y motilidad del intestino), o bien utilizar una cánula simple combinada con un marcador de flujo (que añade más imprecisiones al método). En segundo lugar, aislar una fracción microbiana que sea representativa de toda la microbiota ruminal es complicado, puesto que la composición química de los microorganismos difiere entre los distintos tipos de microbiota (procariotas, protozoos y hongos) y también entre las distintas fases del contenido ruminal (sólida y líquida). En tercer lugar, aunque se hayan utilizado diferentes marcadores microbianos internos (ácidos nucleicos, bases púricas, ácido diaminopimélico, D-alanina, ácido aminoetilfosfónico, perfiles de aminoácidos y ATP) y externos (^{15}N , ^{35}S , ^{32}P); todavía no se dispone de uno que sea ideal. En general, los marcadores internos lo son sólo de determinadas poblaciones microbianas; por ejemplo, el ácido diaminopimélico sólo se encuentra en bacterias (Ling y Buttery, 1978 en Carro, 2001) y el ácido aminoetilfosfónico sólo en protozoos (Horiguchi y Kandtsu, 1959 en Carro, 2001). Además, pueden estar contaminados por marcador de origen dietético, como es el caso de los ácidos nucleicos y las bases púricas (Pérez *et al.*, 1996; Calsamiglia *et al.*, 1996 en Carro, 2001). Los marcadores externos marcan la microbiota y no pueden ser incorporados a la proteína dietética, que es inerte. No obstante, aquellas poblaciones microbianas con mayor actividad o *turnover* proteico mostrarán mayores niveles de incorporación del marcador y, por tanto, el marcaje diferirá entre poblaciones. En este sentido, cabe decir que el hecho de que ciertas secuencias genéticas resistan la degradación enzimática que se produce en el abomaso

permite cuantificar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) las poblaciones microbianas que abandonan el rumen de forma específica, evitando así los errores debidos al metabolismo del propio marcador y al relacionado con la utilización de una población microbiana de referencia (Belanche *et al.*, 2011).

A diferencia de la utilización de marcadores microbianos, la estimación de la excreción urinaria de derivados púricos (DP) constituye una técnica indirecta y no invasiva para la cuantificación del crecimiento microbiano (Balcells *et al.*, 1991). Los fundamentos del método son: (1) las bases púricas (adenina y guanina) duodenales son únicamente de origen microbiano dada la masiva degradación ruminal de las de origen dietético y (2) la excreción diaria de DP en orina está directamente relacionada con la cantidad de purinas microbianas absorbidas (Chen *et al.*, 1990; Balcells *et al.*, 1991). De este modo, conociendo la ratio N-purinas/N-masa microbiana, se puede calcular la absorción de N microbiano a duodeno a partir de la cantidad de purinas absorbidas estimada a partir de la excreción urinaria de DP (Chen *et al.*, 1990; Balcells *et al.*, 1991).

Distintos métodos para determinar los DP en orina ya han sido descritos en la literatura. Los métodos colorimétricos, aunque muy utilizados, son inespecíficos y pueden darse interferencias con la matriz que provoquen una sobreestimación de los resultados (Tas y Susenbeth, 2007 en Boudra *et al.*, 2012). Las técnicas basadas en la separación por cromatografía de líquidos y la detección utilizando radiación ultravioleta son más específicas (Balcells *et al.*, 1992; George *et al.*, 2006; Shingfield *et al.*, 1999 en Boudra *et al.*, 2012) pero pueden presentar problemas debidos a la escasa separación entre DP y otros constituyentes de la orina. Recientemente, el desarrollo de técnicas basadas en la separación molecular por cromatografía de líquidos y la detección por espectrometría de masas ha permitido la detección específica de todos los DP en orina, además de otras moléculas características del metabolismo del N en rumiantes (urea, creatina, creatinina, β -alanina, ácido β -aminobutírico) (Boudra *et al.*, 2012).

La principal dificultad de la técnica de determinación de la excreción urinaria de DP es la necesidad de contabilizar la excreción urinaria diaria de los animales. Para dicho propósito, los animales deben ser alojados en jaulas metabólicas o, alternativamente, pueden ser cateterizados o equipados con depósitos especiales para la recolección de la orina. No obstante, dichos métodos son difícilmente aplicables a determinadas condiciones experimentales. Para solventar los inconvenientes mencionados, se suele estimar la excreción diaria total de orina a partir de la concentración de creatinina en una muestra, asumiendo que (1) la creatinina es un producto del metabolismo de la creatina en el músculo cuya producción y excreción depende directamente de la masa muscular del animal y que (2) su concentración en orina es constante (Chen *et al.*, 1992). De este modo, estableciendo la ratio DP/creatinina en orina y conociendo el peso vivo (PV) de los animales experimentales se puede calcular la excreción diaria de orina sin necesidad de su recolección completa.

II.4 DEGRADACIÓN MICROBIANA DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

II.4.1 Estructura de los hidratos de carbono

II.4.1.1 Monosacáridos y disacáridos

Los monosacáridos o azúcares constituyen los glúcidos más sencillos y pertenecen al grupo de las pentosas (xilosa, arabinosa y ribosa) y las hexosas (glucosa, fructosa, galactosa y maltosa). Las plantas verdes y los forrajes contienen pequeñas cantidades de hexosas libres (1-3% de glucosa+fructosa sobre materia seca [MS] [Bondi, 1989]).

Los disacáridos están formados por dos moléculas de monosacáridos que se condensan formando un enlace glucosídico y eliminando una molécula de agua (Cheeke y Dierenfeld, 2010). Los más comunes en nutrición animal son: sacarosa (glucosa+fructosa; presente en los forrajes en un 2-8% de MS), lactosa (glucosa+galactosa; presente sólo en la leche), maltosa (glucosa+glucosa unidas por un enlace α -1,4; unidad fundamental del almidón y el glucógeno) y celobiosa (glucosa+glucosa unidas por un enlace β -1,4; unidad fundamental de la celulosa) (Bondi, 1989).

II.4.1.2 Polisacáridos

Los polisacáridos son polímeros de monosacáridos, unidos por enlaces glucosídicos.

Los polisacáridos no estructurales más importantes son el almidón (principal carbohidrato de reserva de las plantas y abundante en semillas, subproductos de cereales y tubérculos) y el glucógeno (principal carbohidrato de reserva de los animales, se encuentra en hígado y músculo).

Los polisacáridos estructurales más importantes en la nutrición animal son la celulosa (principal componente estructural de las plantas, representa un 20-40% de la MS de las plantas verdes), la hemicelulosa (mezcla de polisacáridos lineales y ramificados combinados con diversos residuos de azúcares – xilosa, arabinosa, glucosa, galactosa, ácido urónico – que se depositan alrededor de las fibras de celulosa), las pectinas (polisacáridos cuyas cadenas laterales están formadas por arabanos y galactanos, se encuentran en los espacios intercelulares y en capas intracelulares de las plantas funcionando como un cemento intracelular) y la lignina (polímero de derivados del fenilpropano – alcoholes *p*-cumaril, *p*-conilferil, sinapil – que refuerza las fibras de celulosa, sólo representa un 5-10% de la MS de las plantas pero es el principal responsable de su indigestibilidad) (Bondi, 1989).

II.4.2 Fermentación de los hidratos de carbono en el rumen

II.4.2.1 Fermentación de los polisacáridos no estructurales (almidón)

Las poblaciones bacterianas que degradan el almidón se denominan comúnmente bacterias amilolíticas. Dichas poblaciones se adhieren a los gránulos de almidón e inician la síntesis y secreción de amilasa, que actúa secuencialmente sobre los polímeros de almidón liberando unidades libres de glucosa y maltosa.

Las principales especies bacterianas capaces de fermentar el almidón actúan a pH 4.5-7.7 (Therion *et al.*, 1982), utilizan pequeños péptidos, aminoácidos o NH_3 como fuente de N (según especies) y los géneros más comunes son: *Ruminobacter amylophilus*, *Streptococcus bovis*, *Succinomonas amylolytica*, *Prevotella ruminicola*, *Selenomonas ruminantium* y *Fibrobacter succinogenes* (Russell y Hespell, 1981).

La glucosa y otros azúcares simples pueden ser utilizados por las bacterias sacarolíticas, degradándolos a través del proceso de glucolisis para producir energía (ATP) y AGV como productos de excreción. Las principales especies bacterianas que degradan los azúcares sencillos son: *Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium*, *Treponema bryantii*, *Megasphaera elsdenii*, *Lactobacillus spp.* y *Eubacterium ruminantium* (Russell y Hespell, 1981).

Los protozoos holótricos son capaces de fermentar azúcares solubles mientras que los del género *Entodinium spp.* fermentan el almidón (Eadie, 1967; Coleman, 1986 en Belanche, 2008). Se ha demostrado también que los protozoos desempeñan un efecto tampón cuando se administran raciones concentradas, dada su capacidad de fagocitar y secuestrar gránulos de almidón (Wakita y Hoshino, 1989; Russel y Strobel, 1993 en Belanche, 2008) evitando con ello la rápida fermentación bacteriana y reduciendo el riesgo de acidosis.

En el caso de los hongos ruminales, también se ha descrito su capacidad para utilizar carbohidratos solubles como la glucosa, celobiosa y almidón (Mountfort y Asher, 1985; Williams y Orpin, 1987; Morrison *et al.*, 1990; Calza, 1990 en Weimer, 1992).

II.4.2.2 Fermentación de los polisacáridos estructurales (celulosa)

La fermentación de la celulosa no es un proceso lineal como sucedía en el caso de los gránulos del almidón sino que se inicia con la colonización del sustrato por parte de las bacterias celulolíticas. Weimer (1992) describe las cuatro etapas secuenciales de dicho proceso de colonización:

- 1) Transporte de las bacterias inmóviles hasta las partículas de alimento gracias a los fenómenos de motilidad del retículo-rumen.
- 2) Adhesión inespecífica de las bacterias al sustrato. Se trata de un proceso relativamente rápido de naturaleza química.

- 3) Adhesión específica de las bacterias al sustrato mediante la presencia de estructuras como celulosomas (estructura extracelular especializada en facilitar el proceso de adhesión de las bacterias a la fibra, facilitando su degradación [Krause *et al.*, 2003]), fimbrias o determinadas regiones del glucocálix bacteriano. Se trata de un proceso lento que requiere de la síntesis *de novo* de las estructuras de adhesión mencionadas, hecho que explica que sea necesario más tiempo para iniciar la fermentación de los polisacáridos estructurales que de los no estructurales.
- 4) Proliferación bacteriana en el sustrato colonizado.

Se ha demostrado que la colonización suele empezar por las áreas más débiles del tejido vegetal, por ejemplo, en los cortes de las paredes vegetales o en zonas dañadas de la superficie celular (Latham *et al.*, 1978 en Lin *et al.*, 1985).

Las tres poblaciones bacterianas con actividad celulolítica más importantes son: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus* (Weimer, 1992; Krause *et al.*, 2003). Otras poblaciones descritas con menor actividad son: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Eubacterium celulosolvens* y diversas especies de *Clostridium* y *Micromonospora* (Weimer, 1992; Leschine, 1995).

Las tres principales poblaciones celulolíticas utilizan el NH_3 como fuente de N porque no pueden degradar la proteína y tienen una capacidad limitada para utilizar aminoácidos (Weimer, 1992). Además de degradar la celulosa, cada una de las tres especies bacterianas puede utilizar al menos otro polisacárido (*Fibrobacter succinogenes* puede degradar el almidón y las dos especies del género *Ruminococcus* utilizan los xilanos [Russell y Hespell, 1981]), la celodextrina (homopolisacárido originado en la degradación enzimática de la celulosa) y algunos azúcares sencillos (Bryant, 1973; Osborne y Dehority, 1989 en Weimer, 1992). Por último, en relación a las condiciones óptimas para su desarrollo, cabe destacar que las bacterias celulolíticas son más sensibles a los ambientes ácidos que las bacterias que fermentan los polisacáridos no estructurales (Weimer, 1992). Russell y Dombrowski (1980) (en Weimer, 1992) estudiaron en sistemas *in vitro* de fermentación continua el pH por debajo del cual la tasa de crecimiento bacteriano no podía mantenerse en valores de 0.17 h^{-1} . Los resultados fueron 6.15 para *Ruminococcus flavefaciens*, 6.0 para *Fibrobacter succinogenes*, 5.9 para *Ruminococcus albus* y 5.7 para *Butyrivibrio fibrisolvens*. Dichos valores pueden ser todavía más bajos *in vivo* puesto que la tasa de crecimiento bacteriano requerida (en relación al tiempo medio de retención en el rumen del alimento) es mucho menor que en la prueba *in vitro* mencionada.

Los hongos, comunes en el ecosistema ruminal, también participan activamente en el proceso de degradación de la fibra. Parece ser que sus mecanismos de adhesión al sustrato son similares a los descritos para las bacterias puesto que poseen estructuras similares a los celulosomas bacterianos (Steenbakkers *et al.*, 2001; Freelove *et al.*, 2001 en Kruse *et al.*, 2003) y también empiezan la colonización por zonas dañadas de la estructura vegetal (Weimer, 1992;

Kruse et al, 2003). Después de la adhesión, los hongos prosiguen la colonización de la fibra introduciéndose en el lumen de las células de la pared vegetal o en la laminilla media que existe entre ellas donde desarrollan su red de hifas. El crecimiento del micelio fúngico en el interior de las células vegetales provoca el debilitamiento de su pared celular, por lo que nuevas zonas de la estructura de la fibra quedan expuestas a la degradación por parte de toda la microbiota fibrolítica del rumen. Además de su acción física sobre la estructura de la fibra, se ha demostrado que los hongos celulolíticos tienen también una acción enzimática al sintetizar enzimas que degradan ciertos biopolímeros (arabinosilobiosidos y homólogos de los xilanos) que pueden ser limitantes para la fermentación de la pared celular vegetal (Weimer, 1992).

La actividad fibrolítica de los protozoos ruminales ha sido menos estudiada que la del resto de microorganismos ruminales, en parte por la dificultad de su cultivo *in vitro* (Takenaka *et al.*, 2004). Aunque se ha descrito la producción de enzimas fibrolíticas por parte de algunas especies de protozoos (especialmente *Epidinium caudatum* y *Polyplastron multivesiculatum* [Takenaka *et al.*, 2004]), se especula que parte de su actividad degradativa puede ser atribuida a las bacterias simbióticas adheridas o contenidas dentro de los protozoos y que permanecerían metabólicamente activas (Van Soest, 1994).

II.5 DEGRADACIÓN MICROBIANA DE LAS PROTEÍNAS

II.5.1 Estructura de los aminoácidos y de las proteínas

Las proteínas son compuestos orgánicos complejos formados por aminoácidos.

II.5.1.1 Estructura de los aminoácidos y los péptidos

Los aminoácidos se caracterizan por tener un grupo nitrogenado básico y un grupo carboxilo ácido. La mayoría de aminoácidos presentes en las proteínas son de tipo α , con el grupo amino unido al átomo de carbono (C) adyacente al grupo carboxilo. Al mismo átomo de C está unido un radical que varía entre los distintos aminoácidos, pudiendo ser desde un solo átomo de hidrógeno (H) hasta un radical más complejo como un grupo fenilo (McDonald *et al.*, 2010).

Todos los aminoácidos, excepto la glicina, son ópticamente activos; no obstante, solamente los aminoácidos que pertenecen a la serie L se encuentran normalmente en las proteínas y, con pocas excepciones, son los únicos que pueden ser empleados por los animales con fines metabólicos (Bondi, 1989).

Los aminoácidos se unen entre ellos por enlaces peptídicos (en los cuales el N del grupo amino del primer aminoácido se une al grupo carboxilo del segundo con eliminación de agua) para formar cadenas de aminoácidos llamadas péptidos (Bondi, 1989).

Las proteínas se componen de uno o más péptidos. El tipo de aminoácidos, sus cantidades relativas y su disposición secuencial son únicos para cada péptido y caracterizan a cada proteína (Bondi, 1989).

II.5.1.2 Estructura de las proteínas

McDonald *et al.* (2010) distinguen cuatro niveles de estructuración de las proteínas:

- 1) Estructura primaria: secuencia lineal de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.
- 2) Estructura secundaria: conformación de la cadena de aminoácidos que resulta de la formación de puentes de hidrógeno entre grupos imino y carboxilo de aminoácidos adyacentes.
- 3) Estructura terciaria: interacción entre los radicales de distintos aminoácidos dentro de un péptido con estructura secundaria. Dicha interacción provoca el plegamiento de la cadena peptídica sobre sí misma, el cual determina su actividad biológica.
- 4) Estructura cuaternaria: agregación de varias cadenas peptídicas que sólo tienen algunas proteínas.

II.5.2 FERMENTACIÓN DE LA PROTEÍNA EN EL RUMEN

Al igual que en el caso de los carbohidratos, la degradación microbiana de la proteína empieza con la adhesión al sustrato de las bacterias, seguida de la acción de proteasas unidas a la superficie celular (Brock *et al.*, 1982 en Bach *et al.*, 2005). Se estima que entre un 30-50% de los microorganismos que se adhieren al sustrato tienen actividad proteolítica (Prins *et al.*, 1983 en Bach *et al.*, 2005), de lo que se deduce que un gran número de especies microbianas distintas actúan en simbiosis para degradar el sustrato y fermentar los nutrientes. Teniendo en cuenta que una misma proteína presenta muchos tipos de enlaces distintos, es necesaria la acción sinérgica de distintos tipos de proteasas para poderla degradar de forma completa (Wallace *et al.*, 1997 en Bach *et al.*, 2005).

A continuación, los péptidos y aminoácidos resultantes de la proteólisis extracelular son degradados hasta aminoácidos o son desaminados, dando lugar a AGV de cadena ramificada, CO₂ y NH₃ (Tamminga, 1979 en Bach *et al.*, 2005). La degradación de las proteínas hasta NH₃ es un proceso clave para el crecimiento bacteriano puesto que, aunque algunas bacterias del rumen puedan utilizar pequeños péptidos y aminoácidos para su crecimiento, la mayoría utiliza solamente el NH₃ como fuente de N (McDonald *et al.*, 2010).

Las principales especies bacterianas proteolíticas del rumen son *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium lockheadii*, *Streptococcus bovis*, *Prevotella ruminicola*, y *Selenomonas ruminantium* (Russell y Hespell, 1981).

Los protozoos no tienen capacidad para degradar la proteína del rumen (Wallace, 1996). En relación a los hongos, aunque se ha demostrado la presencia de algunos enzimas proteolíticos como aminopeptidasas, experimentos *in vivo* demuestran que su actividad es mínima (Bonnemoy *et al.*, 1993 en Wallace, 1996).

II.5.2.1 Factores que inciden en la degradación de la proteína en el rumen

La proteína de la ración es mayoritariamente fermentada en el rumen por acción de la microbiota ruminal; aunque una fracción, que difiere entre alimentos, puede escapar de la degradación ruminal y ser digerida en el intestino delgado (Cheeke y Dierenfeld, 2010). Esta última fracción se denomina proteína no degradable o *bypass*.

La intensidad del proceso de degradación sobre los diferentes sustratos proteicos depende de múltiples factores. La solubilidad de las proteínas es uno de los factores que determina su degradabilidad: aunque algunos trabajos han observado que las proteínas solubles (i.e. globulinas) son muy degradables y las insolubles (i.e. prolamina y glutelina) poco degradables (Romagnolo *et al.*, 1994 en Bach *et al.*, 2005), otros estudios describen tasas de degradabilidad moderadas en algunas proteínas solubles con enlaces disulfuro (i.e. lactoalbúmina), ilustrando así que la estructura proteica es otro de los factores que incide en su degradabilidad. Así, las proteínas ricas en estructura terciaria y cuaternaria (i.e. harina de pescado, *glutenfeed*) son menos degradables que aquellas que presentan una estructura más simple (i.e. harina de girasol). Se ha demostrado también que determinados enlaces peptídicos (por ejemplo, lisina-prolina y prolina-metionina) son más resistentes a la degradación microbiana (Yang y Russell, 1992 en Bach *et al.*, 2005). Por último, parece ser que la acción de peptidasas y desaminasas bacterianas podría estar regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa por el cual la presencia de productos finales de la degradación proteica inhibiría la síntesis de los enzimas implicados en ella (Velle *et al.*, 1997 en Bach *et al.*, 2005).

La degradación de la proteína del alimento en el rumen no sólo depende de la intensidad de la hidrólisis sino también del tiempo que el alimento está sometido a la acción enzimática, existiendo por ello una relación negativa entre el ritmo de tránsito ruminal y la degradabilidad proteica (Ørskov y McDonald, 1979). El tiempo de permanencia del alimento en el rumen depende, a su vez, de distintos factores. El nivel de ingestión influye en el tiempo de permanencia del alimento en el rumen, habiendo una relación negativa entre ambos parámetros (Dias *et al.*, 2011). Al disminuir la ratio forraje/concentrado de la ración, incrementa el tiempo de retención de la digesta en el rumen (Colucci *et al.*, 1990 en Carro *et al.*, 2000) debido a un descenso en las actividades de rumia y salivación. Por último, la reducción del tamaño de partícula del forraje de la ración facilita su paso por el orificio retículo-omasal y en consecuencia disminuye el tiempo de permanencia del forraje en el rumen (Ramirez *et al.*, 2016).

El pH ruminal y la naturaleza de la ración también intervienen en la degradabilidad de la proteína. Kopečný y Wallace (1982) (en Bach *et al.*, 2005) describieron que el pH de actividad óptimo para el desarrollo de las bacterias proteolíticas varía entre 5.5 y 7. No obstante, estudios posteriores cuestionan dicho valor; por ejemplo, Devant *et al.* (2001) describen menores tasas de degradabilidad *in situ* de la torta de soja en raciones concentradas que en raciones fibrosas, aunque el pH se mantuvo por encima de 6 en ambos casos. Este tipo de

estudios sugieren que la degradabilidad ruminal está afectada por el pH pero también por el tipo de ración, pues ambos parámetros determinan la población y el tipo de fermentación que se establece en el rumen.

La aplicación de distintos tratamientos sobre las materias primas puede reducir la degradabilidad ruminal de su proteína. Los tratamientos más comúnmente utilizados son la aplicación de calor (Tagari *et al.*, [1986] en semillas de algodón y Canbolat *et al.*, [2005] en habas y torta de soja); el tratamiento con compuestos químicos como ácidos o formaldehído (Vicini *et al.*, [1983] en torta de soja) o una combinación de los dos anteriores (Arroyo *et al.*, [2013] en torta de girasol).

Finalmente, citar que diversos autores han comprobado la existencia de relaciones inversas entre la degradabilidad de la proteína y el resto de nutrientes de la ración. Por ejemplo, Assoumani *et al.* (1992) (en Bach *et al.*, 2005) demostraron que la presencia de almidón disminuye la degradabilidad ruminal de la proteína; mientras que Debroas y Blanchart (1993) (en Bach *et al.*, 2005) observaron que la proteína ligada a la fibra no puede ser degradada hasta que no empieza la fermentación de la celulosa, ya que el contenido en pared celular y su integridad limitan el acceso a la proteína por parte de la microbiota ruminal. De este modo, para que la degradación proteica en el rumen sea máxima, se requiere la presencia de multitud de enzimas (proteolíticas y no proteolíticas) y de la acción conjunta de numerosas poblaciones microbianas. Las raciones concentradas, que provocan un bajo pH ruminal, reducen la degradabilidad de la fibra (porque las bacterias celulolíticas son sensibles a las condiciones ácidas) y la degradabilidad proteica (porque el bajo ritmo de degradación de la fibra limita el acceso de las bacterias proteolíticas a la proteína ligada a ella) aunque el recuento de poblaciones proteolíticas no se vea necesariamente reducido (Endres y Stern, 1993 en Bach *et al.*, 2005).

II.6 PRODUCTOS FINALES DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL

Los principales productos finales de la fermentación ruminal son: AGV, masa microbiana, gases y calor de fermentación (Cheeke y Dierenfeld, 2010).

II.6.1 Ácidos grasos volátiles

La producción diaria de AGV ha sido estimada por diversos autores, obteniendo resultados variables debido a las distintas técnicas empleadas para su estimación. Esdale *et al.* (1968) obtuvieron (mediante infusión intraruminal de AGV marcados con ^{14}C) valores de 8.8 y 6.8 moles/kg de MS ingerida (en vacas recibiendo ensilado de maíz y heno, respectivamente) mientras que autores como Stewart *et al.* (1958) y Balch (1958) (ambos en Whitelaw *et al.*, 1970) registraron producciones inferiores (3.4 y 3.6 moles/kg de MS ingerida respectivamente) en incubaciones *in vitro* testando raciones a base de heno y concentrado. En cualquier caso, la producción de AGV es la contribución más importante al metabolismo energético del animal rumiante, representando un 65-75% del total de la energía metabolizable (Bergman, 1990). Las

proporciones de los tres AGV mayoritarios (acético, propiónico y butírico) están influidas por el tipo ración: en raciones forrajeras predomina una fermentación acética (65:20:10) mientras que, en raciones concentradas, incrementará la fracción del ácido propiónico en detrimento del acético (50:40:10) (Cheeke y Dierenfeld, 2010). El 75% de los AGV producidos se absorben directamente en el propio retículo, el resto será absorbido en el omaso y abomaso y sólo el 5% alcanzará el intestino. Tras su absorción, los AGV llegan a los tejidos, donde se oxidan y proporcionan energía para el animal, o al hígado, donde se utilizan para la síntesis de grasa de la leche (ácidos acético y butírico) o glucosa (ácido propiónico) (Bondi, 1989).

II.6.2 Masa microbiana

En general, la producción microbiana en el rumen se sitúa alrededor de 158 g de proteína microbiana/kg de materia orgánica (MO) digerida en el rumen (INRA, 1978) o 36-48 g de proteína microbiana/Mcal de energía metabolizable fermentada en el rumen (AFRC, 1993).

La síntesis microbiana en el rumen no es constante y está modificada por diversos factores.

- 1) Fuente de energía. La rápida degradación de las raciones concentradas provoca una disminución del pH ruminal que deprime la eficiencia de síntesis (Tempest, 1978; Russell y Strobel, 1990; AFRC, 1993 en Belanche, 2008) mientras que las raciones mixtas (forraje y concentrado) potencian el establecimiento de múltiples interacciones sinérgicas entre los microorganismos ruminales que mejoran la eficiencia de síntesis (Stern y Hoover, 1979; Clark *et al.*, 1992 en Belanche, 2008).
- 2) Fuente de N. El NH_3 es la principal fuente de N para el crecimiento bacteriano y su fijación se realiza por dos sistemas enzimáticos principales (Belanche, 2008). Altas disponibilidades de NH_3 activan la vía enzimática de la glutamato deshidrogenasa (Allison, 1970 en Belanche, 2008) mientras que bajas disponibilidades activan el sistema glutamina sintetasa (Erfle *et al.*, 1977; Chalupa, 1980 en Belanche, 2008). Esta segunda vía de incorporación conlleva un mayor gasto energético, y ello reduce la eficiencia de síntesis microbiana. Satter y Slyter (1974) propusieron una concentración umbral de NH_3 de 50 mg/mL a partir de la cual las necesidades de la microbiota eran cubiertas. No obstante, en trabajos posteriores se ha descrito que las concentraciones de NH_3 que optimizan la fermentación del sustrato y la eficiencia de síntesis microbiana serían función del tipo de ración (Firkins *et al.*, 1987 en Belanche, 2008). Si bien es cierto que los procesos de fermentación pueden mantenerse activos en el rumen utilizando únicamente fuentes de N no proteico, la suplementación con N aminoacídico incrementa la eficiencia de síntesis microbiana (Maeng y Baldwin, 1976; Cotta y Russell, 1982 en Belanche, 2008). Las causas de dicho incremento pueden ser el ahorro energético en el proceso de biosíntesis (Demeyer y Van Nevel, 1986 en Belanche, 2008) o un incremento en la disponibilidad de ciertos AGV de cadena ramificada que actúan como factores de crecimiento para algunas especies celulolíticas (Allison y Bryant, 1963 en Belanche, 2008).

- 3) Sincronización en la liberación de energía y nitrógeno. Si cualquier déficit en la disponibilidad de energía o N limita el crecimiento microbiano, una falta de sincronización temporal en la disponibilidad de nutrientes limitaría las tasas de crecimiento y la eficiencia de síntesis. Así, las mejores eficiencias de síntesis se obtienen al administrar fuentes de energía y proteína con ritmos de degradación similares (Sinclair *et al.*, 1995 en Belanche, 2008).
- 4) Ritmo de renovación o *turnover* ruminal. Hespell y Bryant (1979) (en Belanche, 2008) describieron, en experiencias *in vitro*, un aumento en la eficiencia de síntesis microbiana con el ritmo de dilución. Dichos autores hipotetizaron que una mayor proporción de energía era destinada al crecimiento microbiano y que, por tanto, decrecía el porcentaje destinado a funciones de mantenimiento.
- 5) Presencia de protozoos en el rumen. Como ya se ha comentado, los protozoos obtienen N mediante la depredación de otras células, en su mayoría bacterianas. De este modo, la presencia de protozoos incrementa de forma notable la renovación de proteína microbiana (Koenig *et al.*, 2000 en Belanche, 2008), reduciendo por ello la eficiencia de síntesis (Eugène *et al.*, 2004 en Belanche, 2008).

II.6.3 Gases

Los gases producidos durante la fermentación ruminal son: CO₂ (65%), CH₄ (25%) y pequeñas cantidades H₂ e ácido sulfhídrico (Cheeke y Dierenfeld, 2010). Dichos gases son productos del proceso de fermentación ruminal y se emiten por eructación (McDonald *et al.*, 2010).

La producción de CH₄ se sitúa entorno a los 90 kg/animal y año y 65 kg/animal y año en vacuno de leche y carne respectivamente (Sauvant, 1992 en Moumen *et al.*, 2016), lo que implica que un 10% de la energía bruta ingerida se pierda en forma de este gas (McDonald *et al.*, 2010). El CH₄ es sintetizado por tres tipos de poblaciones de arqueas metanogénicas: (1) arqueas hidrogenotróficas, que eliminan actividad reductora del medio (H₂) reduciendo CO₂ a CH₄, (2) arqueas metilotróficas, que producen CH₄ a partir de metanol o metilamina y (3) arqueas acetotróficas que producen CH₄ a partir de la hidrólisis del ácido acético (Hill *et al.*, 2016).

La producción de CH₄ no es constante y puede verse alterada por diversos factores. Puede reducirse por defaunación (Hegarty, 1999a en Cottle *et al.*, 2011), con el empleo de algunos antibióticos ionóforos (Chen y Wolin, 1979; Slyter, 1979 en Cottle *et al.*, 2011) y con la presencia en el medio de determinados compuestos secundarios como los taninos condensados (Waghorn y McNabb, 2003; Tavendale *et al.*, 2009 en Cottle *et al.*, 2011), el ácido mirístico (Odongo *et al.*, 2007 en Cottle *et al.*, 2011) o los flavonoides (Seradj *et al.*, 2014). No obstante, el factor que más altera la producción de CH₄ es el tipo de carbohidrato mayoritario de la ración. Raciones fibrosas incrementan la producción de CH₄ mientras que las raciones concentradas la reducen (Rooke *et al.*, 2014), en la medida que las raciones fibrosas incrementan la producción relativa de ácido acético (cuya ruta de síntesis es contribuidora neta de actividad reductora) mientras que las raciones concentradas incrementan la proporción de

propiónico (cuya ruta de síntesis es netamente consumidora de actividad reductora) (Hungate, 1966).

II.7 METABOLISMO PROTEICO EN EL ANIMAL RUMIANTE

En los rumiantes, los compuestos nitrogenados que llegan al intestino son: proteína microbiana, proteína no degradable de los alimentos y, en menor medida, proteínas de origen endógeno, ácidos nucleicos microbianos y NH_3 procedente de la fermentación ruminal que no pudo ser incorporado a la proteína microbiana ni absorbido (Bondi, 1989).

En los procesos de digestión, las proteínas son hidrolizadas enzimáticamente hasta aminoácidos libres, que son absorbidos en el intestino delgado por un mecanismo de transporte activo. Ya absorbidos, los aminoácidos pasan a vena porta y, finalmente, a hígado (Bondi, 1989) donde seguirán distintas rutas metabólicas. Inicialmente pueden ser incorporados a las proteínas hepáticas o pasar a circulación sistémica y ser incorporados a la proteína de los tejidos periféricos. Ante un exceso en el aporte de aminoácidos, éstos se someterán a un proceso de desaminación en el hígado, por el cual se separará el grupo amino del esqueleto carbonado, cuyo destino final será su oxidación o reutilización para la síntesis de glucosa o ácidos grasos. Por último, el NH_3 entrará en el ciclo de la urea para ser eliminado vía orina (Cunningham, 2003; McDonald, 2010).

II.8 AVANCES METODOLÓGICOS EN EL ESTUDIO DEL METABOLISMO

El desarrollo reciente de la tecnología “ómica” ha permitido tener una visión holística de todas las moléculas que conforman una célula, tejido u organismo bajo la premisa de que el funcionamiento de un sistema complejo sólo se podrá comprender del todo si se estudia de manera global. Así pues, la tecnología “ómica” se basa en la detección de los genes (genómica), ARN mensajero (transcriptómica), proteínas (proteómica) y metabolitos (metabolómica) presentes en una muestra biológica (Horgan y Kenny, 2011). La principal diferencia de los estudios basados en la tecnología “ómica” respecto a los estudios convencionales reside en el planteamiento y resolución de hipótesis: los estudios convencionales buscan aceptar o rechazar una hipótesis previamente definida; por el contrario, los estudios “ómicos” no parten de una hipótesis previa sino que las hipótesis se plantean a partir de los resultados obtenidos en un proceso de planteamiento de hipótesis continuo (Kell y Oliver, 2004 en Horgan y Kenny, 2011).

En el caso de la metabolómica, sus estudios plantean identificar y cuantificar la totalidad de los metabolitos de bajo peso molecular (<1500 Da) con independencia de su origen, endógeno o exógeno (Nicholson *et al.*, 1999; Fiehn, 2002). Los metabolitos son las señales del mapa genético de un organismo y también del ambiente al que está sometido (Jewett *et al.*, 2006 en Roessner y Bowne, 2009); de esta manera, el estudio del perfil de metabolitos en células, tejidos y fluidos puede servir para detectar relaciones entre genes, proteínas y metabolismo (Zhang *et al.*, 2013 en Li *et al.*, 2014).

Los estudios de metabolómica requieren la aplicación de técnicas analíticas sofisticadas (i.e. cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas, cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas, técnicas de resonancia magnética nuclear) así como un análisis estadístico adecuado para el procesamiento de los datos obtenidos y su interpretación (i.e. análisis estadísticos multivariantes, clústeres, mapeado de vías metabólicas o mapas térmicos) (Roessner y Bowne, 2009).

Actualmente existen tres tipos de aproximaciones al estudio de la metabolómica (Fiehn, 2002). (1) El análisis dirigido es un tipo de estudio que se basa en determinar y cuantificar un grupo limitado de metabolitos, utilizando la técnica analítica óptima para dichos metabolitos de interés. (2) Los estudios de perfiles de metabolitos abarcan un mayor número de metabolitos, identificados o desconocidos, combinando cromatografía de gases y espectrometría de masas en una gran diversidad de muestras biológicas (plantas, microorganismos, fluidos biológicos, etc.). (3) En el último caso, se define la “huella metabólica” (concentraciones de los distintos metabolitos que conforman el metaboloma) de un organismo y se procede a su comparación con las huellas metabólicas de un grupo de organismos que conforman una muestra representativa de la población que se pretende analizar, evidenciando sus diferencias. Los metabolitos diferenciales (aquellos que se diferencian entre muestras) son identificados para elucidar su relevancia biológica. Citar que esta última aproximación metodológica permite reducir en gran medida el tiempo de análisis y que en los dos últimos procedimientos se realizan análisis no dirigidos, donde no se buscan metabolitos “diana” previamente conocidos, sino que se analiza el metaboloma completo de los organismos.

Actualmente, el principal punto crítico de los estudios metabolómicos es cómo extraer información relevante de la gran cantidad de datos que se generan y cómo interpretar dicha información desde el punto de vista biológico.

Las muestras biológicas que se emplean para los estudios metabolómicos en animales son fluidos biológicos y extractos de células o tejidos. Los fluidos biológicos son fáciles de obtener; los más comúnmente utilizados son la orina y el plasma aunque se han empleado también muestras de semen, líquido amniótico, líquido sinovial, fluidos digestivos, etc. (Bollard *et al.*, 2005 en Beckonert *et al.*, 2007).

La orina presenta ciertas ventajas, entre las que destacan la presencia de un gran número de metabolitos cuya presencia y concentración responde al estatus fisiológico del organismo y la facilidad en el pretratamiento de las muestras, sin la presencia de una matriz proteica y con poca reactividad entre moléculas (Jacob *et al.*, 2014; Laparre *et al.*, 2017). No obstante, el empleo de orina también conlleva algunos inconvenientes, por ejemplo, las muestras pueden estar sujetas a variación *inter* e *intra* individual y a la propia dilución del metabolito y, además, pueden sufrir alteraciones durante su recolección y conservación posterior (degradación y conversión de metabolitos). Es muy importante en este aspecto estandarizar los protocolos de toma de muestras y las condiciones de almacenaje (tiempo y temperatura) para asegurar la

estabilidad de los metabolitos y la fiabilidad de los resultados (Jacob *et al.*, 2014; Laparre *et al.*, 2017).

En referencia al plasma, su utilización también presenta ventajas. Su homeostasis y su relación bioquímica directa con los tejidos y células del organismo hacen que su perfil metabolómico sea un reflejo del estatus metabólico del individuo. No obstante, el plasma incluye, además de metabolitos de bajo peso molecular, una matriz proteica y lipídica relevante que puede dificultar el proceso analítico (Gowda *et al.*, 2008). Por todo ello, el plasma se considera un fluido biológico con potencial para complementar a la orina en los estudios metabolómicos (Nzoughet *et al.*, 2015a,b en Stella *et al.*, 2017).

En la Tabla 1 se recogen distintos trabajos de metabolómica que realizan un análisis no dirigido de los metabolitos y su campo de aplicación.

Tabla 1 Resumen de distintos trabajos de metabolómica no dirigida. Se presenta el tipo de animal, el objetivo del trabajo, la técnica experimental y el tipo de muestra empleada.

Animal	Objetivo	Técnica experimental	Muestra	Autores
Vaca lechera	Evaluar el metaboloma ruminal de vacas (recibiendo raciones con proporciones crecientes de trigo en grano) para identificar metabolitos que puedan ser indicadores del funcionamiento ruminal y/o sus posibles alteraciones patológicas	Resonancia magnética nuclear de protón	Líquido ruminal	Ametaj <i>et al.</i> , 2010
Vaca lechera	Comparar el metaboloma obtenido en muestras de plasma y leche para (1) entender mejor la fisiología de la lactación, (2) encontrar metabolitos indicadores del estatus sanitario de los animales y (3) encontrar metabolitos relacionados con caracteres productivos relevantes en bovino lechero	Resonancia magnética nuclear	Plasma Leche	Maher <i>et al.</i> , 2013
Vaca lechera	Comparar el metaboloma de vacas con cetosis con el de vacas sin patología para identificar metabolitos diferenciales que discriminen los dos grupos y las vías metabólicas en las que estén involucrados	Cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas	Plasma	Li <i>et al.</i> , 2014
Vaca lechera	Comparar el metaboloma y lipidoma de vacas con estrés por calor con el de vacas sin patología para identificar metabolitos diferenciales que discriminen los dos grupos y las vías metabólicas en las que estén involucrados	Cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas	Plasma	Tian <i>et al.</i> , 2015
Vaca lechera	Comparar el metaboloma de vacas con inactividad ovárica con el de vacas cíclicas (ambas entre 60-90 días <i>post parto</i>) para identificar metabolitos diferenciales que discriminen los dos grupos y las vías metabólicas en las que estén involucrados	Resonancia magnética nuclear de protón	Plasma	Xu <i>et al.</i> , 2016
Terneros castrados	Estudiar los procesos de absorción y metabolismo (en el hígado y demás vísceras irrigadas por la vena porta) de los ácidos grasos de cadena corta	Resonancia magnética nuclear de protón	Plasma	Bertram <i>et al.</i> , 2005
Terneros	Estudiar el metaboloma del hígado en terneros que han sido tratados con esteroides para identificar posibles alteraciones en el metabolismo hepático	Cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas	Tejido hepático	Stella <i>et al.</i> , 2017
Vacas (Frisona y Jersey), yak, búfalo, cabra, camello, yegua	Estudiar el metaboloma de la leche de distintas especies de mamíferos para encontrar metabolitos que puedan ser indicadores de (1) caracteres productivos relevantes en ganado lechero y (2) adulteración de la leche	Resonancia magnética nuclear Cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas	Leche	Yang <i>et al.</i> , 2016

III. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Los sistemas ganaderos intensivos y altamente especializados, como lo es el de engorde de terneros en nuestra región, se enfrentan actualmente a distintos retos. Por un lado, la búsqueda de nuevas fuentes de proteína con el objetivo de reducir la dependencia a la soja. Por otro lado, la optimización del nivel de proteína de la ración, que permitiría reducir su coste y la emisión de compuestos nitrogenados contaminantes.

Por todo ello, el presente trabajo se planteó como objetivo principal analizar el impacto, sobre los parámetros productivos y metabólicos, de una reducción en el nivel de proteína bruta (PB) de la ración y de un incremento en el aporte y la calidad del forraje; en terneros frisonos en fase de crecimiento y sometidos a un régimen de cebo intensivo.

Del mencionado objetivo general se derivaron los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluar la respuesta a una reducción en el aporte de PB por debajo de los niveles convencionales (15-17% materia fresca [MF]) propuestos por FEDNA (2008).
2. Evaluar la respuesta a un incremento de la ingestión de forraje al mejorar la calidad del mismo, sustituyendo la paja de cebada (*Hordeum vulgare*) por un ensilado de gramínea (*Avena sativa*) o de leguminosa (*Vicia sativa*).

Para la consecución de dichos objetivos, se diseñó una prueba con 80 terneros machos de raza Frisona en período de crecimiento. Los animales se organizaron en cuatro tratamientos experimentales definidos por cuatro raciones distintas, que estaban compuestas por concentrado de baja proteína (10% MF) y paja de cebada (1-BP) o por concentrado estándar (12% MF) y uno de los tres siguientes forrajes: paja de cebada (2-CTR), ensilado de avena (3-AV) o ensilado de veza (4-VZ).

Para analizar el efecto del tratamiento se realizaron las siguientes determinaciones experimentales.

Se analizaron el crecimiento y el consumo de concentrado de los animales, que se registraron de forma automática en granja. Para determinar el consumo de forraje se utilizó un sistema de doble marcado: las cenizas insolubles en ácido (CIA) se utilizaron como marcador interno y el óxido de cromo (Cr_2O_3) como marcador externo para determinar la excreción total de heces. De esta forma, se pudieron determinar la ingestión, excreción y digestibilidad de los distintos nutrientes a nivel individual y el rendimiento productivo de los animales. A partir de los datos de ingestión y excreción (fecal y urinaria) de N se calculó el balance de N.

La determinación de la concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH_3) y AGV, así como el pH del líquido ruminal, nos permitió caracterizar la fermentación ruminal. Por su lado, la secuenciación de regiones variables del ARNr 16S sirvió para establecer la estructura de la

microbiota ruminal de los animales, en términos de poblaciones bacterianas y de arqueas. La síntesis de proteína microbiana en el rumen se calculó a partir de la excreción urinaria de DP.

Por último, el impacto del tratamiento experimental sobre el perfil metabolómico de los animales se determinó mediante el análisis por cromatografía de líquidos y espectrometría de masas de muestras de orina y plasma.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1 ANIMALES Y LOCALIZACIÓN

Para el estudio, se utilizaron 80 terneros machos de raza Frisona y de origen francés.

Los animales se alojaron en corrales semicubiertos, hormigonados y orientados al sur para evitar heladas y vientos dominantes en la granja experimental Montsuà, perteneciente a la Cooperativa d'Ivars d'Urgell, SCCL (Ivars d'Urgell, Pla d'Urgell). Los terneros siempre dispusieron de paja abundante y limpia y libre acceso al agua de bebida.

Previamente al inicio del estudio, los animales se distribuyeron en cuatro corrales o lotes experimentales equilibrándolos por el PV.

IV.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Las raciones o tratamientos experimentales consistieron en:

- 1) Grupo baja proteína (1-BP): concentrado baja proteína (10% PB sobre MF) y paja de cebada (*Hordeum vulgare*) como forraje, ambos *ad libitum*.
- 2) Grupo control (2-CTR): concentrado estándar (12% PB sobre MF) y paja de cebada (*Hordeum vulgare*) como forraje, ambos *ad libitum*.
- 3) Grupo ensilado de avena (3-AV): concentrado estándar (12% PB sobre MF) y ensilado de avena (*Avena sativa*) como forraje, ambos *ad libitum*.
- 4) Grupo ensilado de veza (4-VZ): concentrado estándar (12% PB sobre MF) y ensilado de veza (*Vicia sativa*) como forraje, ambos *ad libitum*.

La composición en ingredientes, química y en nutrientes de los alimentos que conformaron las cuatro raciones se detalla en la Tabla 2 y Tabla 3.

Tabla 2 Composición en ingredientes, química y en nutrientes de los dos concentrados utilizados en la prueba experimental.

Parámetro ¹	Concentrado baja proteína ²	Concentrado estándar ³
Composición en ingredientes (% MF)		
Maíz	51.74	45.40
Tercerillas/Cuartas	24.88	21.89
DDGS de maíz	1.38	10.91
Pastone	4.98	7.96
Cebada	-	2.99
Carbonato cálcico	2.10	2.49
Cascarilla de soja	0.73	2.07
Palmiste	9.83	1.99
Aceite de palma	2.05	1.76
Melaza de caña	1.00	1.00
Bicarbonato sódico	0.75	0.75
Sal	0.37	0.35
Urea	-	0.24
Corrector vitamínico-mineral	0.20	0.20
Composición química		
MS (% MF)	85.84	86.15
Cenizas (% MS)	6.05	6.31
PB (% MS)	11.50	13.93
EE (% MS)	6.82	5.52
FND (% MS)	20.71	20.25
FAD (% MS)	7.85	7.07
Composición en nutrientes		
UFC (UFC/kg MS)	0.98	1.01
PDIN (g/kg MS)	81.60	93.50
PDIE (g/kg MS)	86.40	93.80
PDIN/UFC	83.27	92.57
PDIE/UFC	88.16	92.87
¹ DDGS: <i>Dried distillers grains with solubles</i> ; MF: materia fresca; MS: materia seca; PB: proteína bruta; EE: extracto etéreo; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; UFC: unidades forrajeras carne; PDIN: proteína digestible en el intestino procedente del nitrógeno; PDIE: proteína digestible en el intestino procedente de la energía. ² Concentrado que conforma la ración experimental del grupo 1-BP. ³ Concentrado que conforma la ración experimental de los grupos 2-CTR, 3-AV y 4-VZ.		

Tabla 3 Composición química y en nutrientes de los tres forrajes utilizados en la prueba experimental.

Parámetro ¹	Paja de cebada ²	Ensilado de avena ³	Ensilado de veza ⁴
Composición química			
MS (% MF)	84.00	38.15	57.87
Cenizas (% MS)	18.75	7.39	9.26
PB (% MS)	6.47	9.38	17.94
EE (% MS)	1.70	2.92	1.81
FND (% MS)	75.45	51.72	44.21
FAD (% MS)	43.77	28.50	28.18
Composición en nutrientes			
UFC (UFC/kg MS)	0.36	0.55	0.70
PDIN (g/kg MS)	40.83	57.64	103.00
PDIE (g/kg MS)	52.61	55.96	65.00
ULB	1.47	1.32	1.04
PDIN/UFC	113.42	104.80	147.14
PDIE/UFC	146.14	101.75	92.86
¹ MF: materia fresca; MS: materia seca; PB: proteína bruta; EE: extracto etéreo; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; UFC: unidades forrajeras carne; PDIN: proteína digestible en el intestino procedente del nitrógeno; PDIE: proteína digestible en el intestino procedente de la energía; ULB: unidades lastre bovino. ² Forraje que conforma la ración experimental de los grupos 1-BP y 2-CTR. ³ Forraje que conforma la ración experimental del grupo 3-AV. ⁴ Forraje que conforma la ración experimental del grupo 4-VZ.			

IV.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los terneros entraron al cebadero con 94 (± 6) días de edad y un PV medio de 125 (± 14.5) kg e iniciaron la fase de adaptación a las instalaciones, durante la cual los animales recibieron un pienso concentrado comercial (*vedells starter*, Cooperativa d'Ivars d'Urgell, SCCL) y paja de cebada *ad libitum* durante 28 días. Finalizado este período, a los 122 (± 6) días de edad y 167 (± 20) kg se inició la adaptación de los animales a las raciones o tratamientos experimentales, que se mantuvo durante 35 días. A los 157 (± 6) días de edad y 224.5 (± 21) kg de PV, cuando los animales ya habían terminado el período de adaptación a las raciones experimentales, se realizó el muestreo. La fase de crecimiento se dio por finalizada cuando los animales alcanzaron los 409.5 (± 31) kg de PV, a los 272 (± 6) días de edad aproximadamente.

Mediante la toma de muestras, se pretendió analizar la relación entre el tratamiento experimental y el perfil metabólico de los animales (determinado a partir de muestras de sangre y orina), su cinética ruminal y su producción de proteína microbiana a partir de la excreción urinaria de DP. El muestreo se realizó a 10 animales de cada grupo experimental y el tipo de muestras y los parámetros a analizar se resumen a continuación:

- 1) Sangre:
 - a) Concentración de urea, creatinina y proteínas totales en plasma.
 - b) Perfil metabólico en plasma.

- 2) Líquido ruminal:
 - a) Concentración de AGV y N-NH₃.
 - b) Microbioma ruminal (población de bacterias, arqueas y protozoos).
- 3) Orina:
 - a) Concentración de N total.
 - b) Concentración de urea, creatinina y DP (alantoína y ácido úrico).
 - c) Perfil metabolómico en orina.
- 4) Alimentos (piensos y forrajes):
 - a) Concentración de marcadores interno y externo.
 - b) Principios inmediatos.
- 5) Heces:
 - a) Concentración de marcadores interno y externo.
 - b) Principios inmediatos.

Durante el período de crecimiento, objeto del presente estudio, se controló de forma automática el peso y el consumo de concentrado de los animales (n=80) mediante una estación de alimentación con un comedero de tipo manga de manejo individual o túnel (de ancho regulable para que entrara sólo un animal). En el extremo de la manga había un comedero individual (200 kg de capacidad) en el que se mantenía constante la disponibilidad de pienso (llenándose una o dos veces diarias). Dicho comedero estaba situado sobre una báscula, la misma báscula-plataforma donde se colocaban los terneros para comer. Al entrar el ternero, se leía su chip (colocado en la oreja de los animales), se identificaba y se pesaba dos veces, a la entrada y a la salida. La entrada nos proporcionaba el peso del animal y la diferencia entre ambas pesadas el consumo de concentrado. También se registraba el tiempo entre pesadas, que se definió como tiempo de consumo. De esta forma, se pudieron contabilizar los pesos individuales diarios de los animales, su consumo de concentrado individual diario, el tiempo de ingestión total y el número de ingestas diarias.

Para determinar el consumo de forraje, que fue ofrecido de forma independiente al concentrado, se utilizó un sistema de doble marcado: el Cr₂O₃ como marcador externo y las CIA como marcador interno.

El marcador interno nos permitió determinar la digestibilidad de la ración y el externo (administrado de forma controlada en el concentrado) estimar la excreción fecal. La ingestión individual de forraje se calculó por diferencia entre la ingestión total (obtenida a partir de las estimaciones de digestibilidad total y excreción fecal) y la ingestión de concentrado (registrada de forma automática).

IV.4 PROCEDIMIENTO DE MUESTREO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

IV.4.1 Alimentos y heces

Se tomaron muestras de todos los alimentos (100 g de concentrado y 500 g de forraje) y se dividieron en dos partes: una parte se conservó en refrigeración (4°C) para determinar la MS y el resto se molió (2 mm Ø) con un molino de martillos y se conservó (4°C) hasta su análisis. En el caso de los ensilados, el protocolo se modificó ligeramente y se dividieron en dos partes: una parte se congeló (-20°C) para determinar la MS y el resto se secó (60°C hasta peso constante), se molió (2 mm Ø) y refrigeró (4°C) hasta su análisis.

Tras 7 días de ingestión del marcador externo (Cr_2O_3), se procedió al muestreo de las heces, mediante estimulación y extracción directa del recto. Las muestras (50 g) se tomaron durante 4 días consecutivos y fueron refrigeradas inmediatamente (caja isoterma con acumuladores de frío) hasta su llegada al laboratorio (3 horas), donde se congelaron (-20°C). Al final del período de muestreo, las muestras de cada animal se descongelaron, agruparon y subdividieron en dos partes: una parte se destinó a determinar el contenido en MS mientras que el resto se secó (60°C hasta peso constante), se molió (2 mm Ø) y se conservó (4°C) hasta su análisis.

IV.4.2 Líquido ruminal

Los animales muestreados se inmovilizaron y se les extrajo líquido ruminal del saco ventral del rumen mediante una sonda esofágica conectada a una bomba de vacío. Se realizaron dos extracciones de 200 mL de líquido ruminal: el líquido obtenido en la primera extracción se descartó (para evitar una posible contaminación por saliva que pudo haber quedado alojada en el interior de la sonda al atravesar la boca y el esófago de los animales) mientras que el de la segunda extracción se filtró con una gasa quesera, se le tomó el pH con un pH metro portátil (Testo 205, Testo AG, Alemania) y se subdividió en distintas alícuotas:

- 1) Dos alícuotas de 4 mL que se acidificaron (1 mL de ácido ortofosfórico 0.5 M incluyendo ácido 4-metilvalérico 50 mM como patrón interno) para el análisis de los AGV. Las alícuotas se congelaron con nieve carbónica en la propia explotación, conservándose en la misma condición (-20°C) a su llegada al laboratorio. Previo a su análisis, las muestras se descongelaron y se centrifugaron (3,500 rpm – 20 min – 4°C) y el sobrenadante se trasvasó a un tubo de microcentrífuga para proceder a una segunda centrifugación (13,800-14,000 xg – 20 min – 4°C). Finalmente, el sobrenadante se trasvasó a un vial de cromatografía.
- 2) Dos alícuotas de 2 mL que se acidificaron (0.8 mL de ácido clorhídrico 0.5 N) para el análisis de N-NH_3 . Las alícuotas se congelaron con nieve carbónica en la propia explotación, conservándose en la misma condición (-20°C) a su llegada al laboratorio. Previo a su análisis, las muestras se descongelaron y se centrifugaron (13,800 xg – 30 min).

- 3) Una alícuota (15 mL) se destinó al análisis de las poblaciones bacterianas y de arqueas del rumen. Para ello, la alícuota se congeló con nieve carbónica en la propia explotación y posteriormente se liofilizó (Cryodos, Telstar, España), conservando las muestras liofilizadas en ultracongelación (-80°C) hasta proceder a la extracción del ADN microbiano (kit: QIAamp DNA Stool Mini Kit, Cat. No/ID: 51504; QIAGEN N.V.; Alemania). Brevemente, la extracción de ADN con el kit constó de tres fases principales:
 - a) Lisis celular con un tampón.
 - b) Absorción de las impurezas (inhibidores de PCR o compuestos que pueden degradar el ADN) en una matriz.
 - c) Purificación del material genético en una columna de centrifugación, que incluye: digestión de las proteínas, unión del ADN en la membrana de sílice de la columna de centrifugación, lavado de las impurezas y elución final del material genético.Los extractos de ADN se conservaron congelados (-20°C) hasta su secuenciación.
- 4) Una alícuota de 2 mL de líquido ruminal se mezcló con 2 mL de una solución de cloruro sódico (9 g/L), utilizando formaldehído (10% v/v) como conservante, para determinar el contenido de protozoos. La alícuota se conservó en frío (caja isoterma con acumuladores de frío) hasta su llegada al laboratorio, donde se mantuvo refrigerada (4°C).

IV.4.3 Sangre

Se extrajeron 10 mL de sangre por vena coccígea con aguja (18 G - 25 mm) en un tubo de vacío con ácido etilendiaminotetraacético. Las muestras se refrigeraron (caja isoterma con acumuladores de frío) para su traslado al laboratorio, donde se centrifugaron (3,500 rpm - 10 min) para extraer el plasma, que fue dividido en dos alícuotas de 1 mL que se conservaron en congelación (-20°C).

Una de las dos alícuotas sirvió para el estudio del perfil metabolómico. Para ello, se realizó una extracción de metabolitos previa al análisis que se resume a continuación:

- 1) 30 µL de muestra se trasvasaron a un tubo de microcentrífuga y se les añadieron 90 µL de metanol frío con fenilalanina (1 µg/mL), marcada isotópicamente con un ¹³C (C₆H₅CH₂(NH₂)¹³CO₂H) como patrón interno, y con butilhidroxitolueno (1 µM) como antioxidante.
- 2) Se mezcló en vórtice (1 min) y, tras dejarlo en reposo (-20°C – 60 min), se centrifugó (12,000 rpm – 3 min) para precipitar las proteínas.
- 3) El sobrenadante se trasvasó a un tubo de microcentrífuga (0.22 µm Ø de poro de membrana [UltraFree UFC3LTK00, Millipore, EUA]) y se centrifugó (3,000 rpm – 10 min – 4°C) para filtrar las impurezas.
- 4) Se traspasó la solución filtrada a un vial de cromatografía.

IV.4.4 Orina

Las muestras de orina se tomaron estimulando la micción mediante un masaje en la zona del prepucio y se filtraron utilizando un colador (1 mm Ø). Las muestras fueron divididas en cinco alícuotas (1 mL) que se congelaron con nieve carbónica en granja y fueron conservadas en ultracongelación (-80°C) al llegar al laboratorio.

Una de las cinco alícuotas sirvió para el estudio del perfil metabolómico. Para ello, se procedió a su purificación según lo descrito previamente (apartado IV.4.3).

IV.5 MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS

IV.5.1 Principios inmediatos en alimentos, heces y orina

El contenido de MS, cenizas y N de los alimentos y las heces fueron determinados según los procedimientos descritos por la AOAC (2000). El contenido en MS se determinó mediante secado en la estufa (102°C) hasta peso constante (referencia 934.01). El contenido en cenizas se obtuvo por incineración de la muestra en un horno mufla (550°C) durante 3 horas (referencia 942.05).

El contenido en N de los alimentos, las heces y la orina se analizó por el método Dumas (referencia 990.03) utilizando un equipo LECO FP-528 (Leco Corporation, EUA). El procedimiento se resume en los siguientes pasos:

- 1) Incineración de la muestra a 850°C.
- 2) Los gases generados (CO₂, agua (H₂O), gas nitrógeno (N₂), NO_x) pasan a través de cobre caliente para reducir los NO_x a N₂.
- 3) Los gases se filtran: en el primer filtro (Lecosorb) se retiene el CO₂ y en el segundo (Anhidrona) el H₂O.
- 4) Se mide el N₂ con helio portador en una celda de termoconductividad diferencial.

Los análisis de fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD) de los alimentos y las heces se realizaron siguiendo el procedimiento secuencial descrito por Van Soest *et al.* (1991) con el analizador de fibras Ankom200/220 (Ankom Technology, EUA). En el caso de la FND, se realizó una hidrólisis previa con una amilasa termoestable.

La determinación del contenido en extracto etéreo (EE) en alimentos y heces se realizó por el método de extracción Randall (AENOR, 2015) utilizando un extractor DET-GRAS (J.P. Selecta, España). La extracción constó de dos pasos:

- 1) Inmersión de la muestra en el solvente en ebullición.
- 2) Extracción del EE mediante un flujo continuo de disolvente condensado. Al finalizar el proceso, el disolvente se evapora y se recupera por condensación. El residuo de grasa cruda resultante se determina gravimétricamente después del secado.

IV.5.2 Marcadores interno y externo en alimentos y heces

El contenido en CIA de alimentos y heces se determinó utilizando una modificación del procedimiento estándar (BOE, 1995) que se comenta brevemente a continuación:

- 1) Incinerar las muestras según el método descrito para la determinación de las cenizas (apartado IV.5.1).
- 2) Traspasar las cenizas a un matraz de Erlenmeyer de 250 mL.
- 3) Añadir 75 mL de ácido clorhídrico 3 N y mantener en ebullición suave durante 15 minutos.
- 4) Filtrar la solución en caliente sobre un papel de filtro libre de cenizas y lavar el matraz de Erlenmeyer con agua caliente para recoger los restos de residuo.
- 5) Secar el filtro que contiene el residuo e incinerar en un crisol tarado (550°C – 3 horas).
- 6) Dejar enfriar el crisol y su contenido en un desecador y pesar para calcular el contenido en CIA.

Para determinar el contenido en cromo de las heces y los concentrados se calcinó la muestra y se digirió en un baño de arena con ácido clorhídrico. A continuación, las muestras se analizaron por espectrometría de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente (Activia, Horiba Jovin Yvon, Japón) según el método propuesto por la EPA (2007).

IV.5.3 Ácidos grasos volátiles en líquido ruminal

La concentración molar de AGV se determinó por cromatografía de gases siguiendo la técnica propuesta por Jouany (1982), utilizando un cromatógrafo de gases (Bruker 436 Scion con detector FID y software Compass CDS, Bruker, EUA) equipado con una columna capilar (GS-BR-SWAX 30m x 0.25 mm D.I. x 0.25 μ m de grosor de película, Bruker, EUA). Las condiciones cromatográficas se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4 Condiciones cromatográficas en las que se realizó el análisis de la concentración de ácidos grasos volátiles en líquido ruminal.

Parámetro	Condiciones
Inyección	
Jeringa (10 μ L)	Inyección 1 μ L (0.1 min) Split 1:50
Temperatura	220°C
Flujo de columna (He)	1 mL/min
Flujo total	55-68.4 mL/min
Velocidad lineal	19 cm/seg
Horno	
Temperatura inicial	110°C
Temperatura final	158°C
Rampa	6°C/min
Tiempo final	8 min
Detector FID	
Temperatura	230°C
Flujo de He	30 mL/min
Flujo H ₂	30 mL/min
Flujo gas combustión	300 mL/min
H ₂ : gas hidrógeno; He: helio	

IV.5.4 Nitrógeno amoniacal en líquido ruminal

La concentración de N-NH₃ se determinó según el método propuesto por Chaney y Marbach (1962) utilizando un lector espectrofotométrico de placas ELISA (Epoch, BioTek Instruments, EUA).

El método espectroscópico se basa en la medida de absorbancia del azul de indofenol, compuesto que se forma en la reacción de Berthelot. En este proceso intervienen fenol, hipoclorito de sodio, el NH₃ de las muestras y nitroprusiato sódico en tres fases distintas que transcurren a pH básico (Lau *et al.*, 2004; Moliner-Martínez *et al.*, 2005):

- 1) El NH₃ de las muestras reacciona con el hipoclorito de sodio formando cloramina.
- 2) La cloramina reacciona con el fenol dando lugar a una monocloroiminoquinona.
- 3) La monocloroiminoquinona es un compuesto intermedio que se combina con otra molécula de fenol para dar finalmente azul de indofeno.

IV.5.5 Recuento de protozoos en líquido ruminal

Para el recuento de protozoos totales se realizó una lectura en el microscopio óptico siguiendo el método descrito por de la Fuente *et al.* (2006).

IV.5.6 Metagenoma: poblaciones bacterianas y de arqueas en líquido ruminal

El estudio de la diversidad bacteriana y de arqueas se realizó mediante la secuenciación de regiones variables de ARNr 16S.

La secuenciación del 16S para el análisis de metagenómica se realizó según las siguientes fases:

- 1) Extracción del ADN.
- 2) Preparación de librerías 16S.
- 3) Secuenciación.
- 4) Análisis bioinformático.

Una vez ya extraído el ADN de las muestras (apartado IV.4.2), los procesos de preparación de librerías 16S y secuenciación se externalizaron (Era7 Bioinformatics, Granada, España). El ARNr 16S contiene nueve regiones hipervariables (denominadas de la V1 a la V9) que son suficientemente diferentes entre especies microbianas como para poderse utilizar para su identificación. Dichas regiones hipervariables están flanqueadas por regiones conservadas de ARNr entre especies, por lo que es sencillo amplificar por PCR las regiones hipervariables utilizando cebadores específicos (Chakravorty *et al.*, 2007). En nuestro caso, se amplificaron las regiones V3 y V4, utilizando los siguientes cebadores específicos:

Forward = 5':

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

Reverse = 5':

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

A grandes rasgos, la preparación de librerías 16S engloba la amplificación por PCR del ADN extraído de la muestra utilizando cebadores específicos de las regiones de interés, la purificación de los amplicones obtenidos (para eliminar cebadores libres y dímeros de cebadores), la cuantificación y normalización de la librería y su desnaturalización previa a la secuenciación (Illumina Inc, 2017).

La secuenciación se realizó con *Illumina* (MiSeq run PE 2x300, Illumina, Inc., EUA), una plataforma de secuenciación de alto rendimiento. El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se dividió en las siguientes fases:

- 1) Ensamblaje o *Merging* de las secuencias.
- 2) Control de calidad de las secuencias.
- 3) Asignación taxonómica.

La tecnología *Illumina* trabaja con secuencias emparejadas (en inglés, *paired reads*), es decir, un mismo amplicón de la librería se secuenciará a partir de sus dos extremos. De este modo, si el amplicón es más corto que dos veces el tamaño de las secuencias generadas, éstas se solaparán en un extremo de forma que se podrán obtener secuencias más largas que facilitarán el proceso de clasificación taxonómica. El correcto ensamblaje de las secuencias es una etapa clave del proceso global para la cual se han desarrollado distintas herramientas informáticas que funcionan alineando las distintas secuencias a unir y ensamblando aquellas que presentan la complementariedad de bases más alta (Parikh *et al.*, 2016). En nuestro caso, el ensamblaje se realizó utilizando el programa FLASH (en inglés, *Fast Length Adjustment of Short reads* [Magoč y Salzberg, 2011]). Las secuencias que no pudieron ser ensambladas se consideraron no viables para análisis posteriores y fueron descartadas.

En la fase de control de calidad, las secuencias de baja calidad (bases erróneas, pequeñas inserciones o deleciones) fueron detectadas y eliminadas, previo a la fase de clasificación para evitar errores de asignación (Parikh *et al.*, 2016). En dicho proceso de control de calidad, se asigna a cada base una puntuación que se relaciona logarítmicamente con la probabilidad del error (Richterich, 1998) y se establece una puntuación de calidad umbral: aquellas secuencias que tengan una puntuación media igual o superior a la umbral serán consideradas de alta calidad mientras que las que no la superen serán consideradas de baja calidad y serán descartadas para los siguientes análisis (Patel y Jain, 2012). En el presente trabajo, el control de calidad de las secuencias se realizó con la herramienta FastQC (Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Reino Unido).

Realizado el control de calidad, se procedió a la asignación taxonómica de las secuencias de alta calidad. Para ello, se utilizó el programa de alineamiento de secuencias BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; National Center for Biotechnology Information [NCBI], EUA). Dicho programa, compara una secuencia problema (cada una de las secuencias de alta calidad obtenidas) contra las secuencias albergadas en una base de datos y se seleccionan aquellas con una mayor semejanza a la secuencia problema. En nuestro caso, se utilizó la base de datos 16S-DB7 con secuencias 16S extraídas de la base de datos RNACentral, que incluye a su vez secuencias de muchas otras bases de datos importantes (SILVA, GreenGenes, RDP, RefSeq y ENA) (Era7 Information Technologies, 2016).

La asignación taxonómica definitiva se realizó mediante el paradigma del ancestro común más bajo o LCA (del inglés *Lowest Common Ancestor*). Para ello se seleccionaron los mejores alineamientos obtenidos con BLAST (es decir, aquellos alineamientos con mayor grado de similitud) y se colocaron en un árbol taxonómico. La clasificación taxonómica definitiva fue la del ancestro común más cercano que englobara todos los taxones de los mejores alineamientos seleccionados (Era7 Information Technologies, 2016). En nuestro caso, la asignación taxonómica se realizó según la base de datos *Taxonomy* del NCBI (EUA).

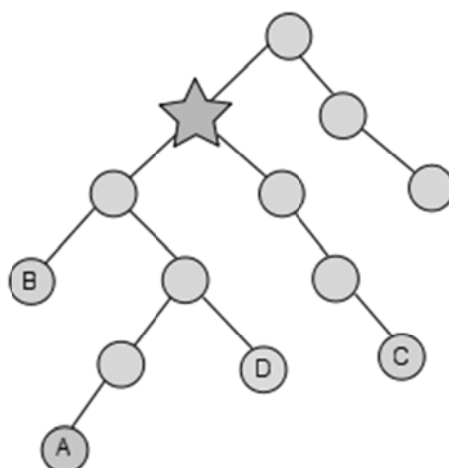


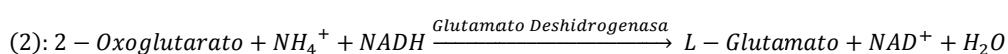
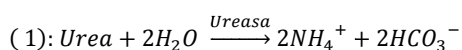
Figura 1 Asignación taxonómica por el paradigma del ancestro común más bajo o LCA. Las letras A, B, C y D representan los cuatro mejores alineamientos de la secuencia problema obtenidos por BLAST. El taxón marcado con una estrella sería el finalmente asignado a la secuencia problema porque es el ancestro común más bajo que engloba los cuatro mejores alineamientos. Fuente: Bio4j

Cada taxón englobó un grupo de secuencias cuasi idénticas (consideradas como pertenecientes a genomas idénticos) y recibió el nombre de “unidad taxonómica operacional” o OTU (por las siglas del inglés *Operational Taxonomic Unit*). Se considera muy difícil definir una secuencia única del gen 16S ya que algunas regiones del gen son variables o hipervariables (algunos pares de bases pueden cambiar en períodos muy cortos de tiempo), sin descartar errores de secuenciación, etc. Por ello no se precisa que las secuencias 16S sean idénticas entre individuos de la misma especie.

IV.5.7 Metabolitos y proteínas totales en plasma

La determinación de la concentración de urea, creatinina y proteínas totales en plasma se realizó con un kit comercial en la empresa Laboratorios Albéitar, S.C. (Zaragoza, España). Los resultados se leyeron con un autoanalizador de química analítica (Gernonstar, RAL, España) para la determinación *in vitro* de magnitudes bioquímicas y turbidimétricas.

La determinación de urea (kit: GN 71000, RAL, España) se realiza mediante la reacción Ureasa - Glutamato Deshidrogenasa (ecuaciones 1 y 2), por la cual la reducción en la concentración de NADH es proporcional a la concentración de urea en la muestra.



La determinación de la concentración de creatinina (kit: GN 30100, RAL, España) se basa en una reacción colorimétrica por la cual la creatinina y el ácido pícrico reaccionan en medio

básico. El incremento de densidad óptica medido es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra.

La determinación de la concentración de proteínas totales (kit: GN 46500, RAL, España) se basa en el método del Biuret, por el cual las proteínas forman un complejo con iones de cobre de color azul-violeta. La absorbancia del color es proporcional a la concentración de proteínas en la muestra.

IV.5.8 Urea, creatinina y derivados púricos en orina

El análisis de la urea, creatinina y DP en orina se realizó por cromatografía de líquidos y espectrometría de masas en el servicio científico-técnico de desarrollo y aplicación de técnicas cromatográficas y de espectrometría de la Universidad de Lleida (Lleida, España).

El equipo de cromatografía líquida de ultra resolución que se utilizó fue el modelo Acquity de Waters (Waters Corporation, EUA). La separación de los analitos se realizó en una columna Acquity UPLC® BEH Amide 1.7 μm (150*2.1mm, Waters Corporation, EUA). Como espectrómetro de masas se utilizó un detector tándem MS/MS tipo triple cuadrupolo de Waters, modelo Acquity TQD (Waters Corporation, EUA).

El método analítico empleado fue el propuesto por Boudra *et al.*, (2012) con algunas modificaciones relativas a las condiciones cromatográficas. La separación se realizó empleando una elución en gradiente (Tabla 5). El solvente A fue acetonitrilo con un 0.1% de ácido fórmico. El solvente B fue una dilución de metanol en agua (1:49) con un 0.1% de ácido fórmico. El volumen de inyección fue 5 μL . La temperatura de la columna y de las muestras se mantuvo a 30°C y 10°C respectivamente.

Tabla 5 Condiciones de la elución en gradiente empleada para la separación de los analitos por cromatografía de líquidos de ultra resolución en la determinación de urea, creatinina y derivados púricos en orina.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
Inicio	0.4	80	20
1.00	0.4	80	20
2.00	0.4	60	40
2.10	0.5	60	40
4.00	0.5	60	40
4.01	0.4	80	20
5.50	0.4	80	20

IV.5.9 Perfil metabólico en plasma y en orina

El estudio del perfil metabólico de los animales se realizó combinando cromatografía de líquidos y espectrometría de masas en el servicio de metabolómica de la Universidad de Lleida (Lleida, España). El equipo de cromatografía líquida de ultra-alta resolución que se utilizó es el modelo 1290 de Agilent (Agilent Technologies, España) acoplado a un espectrómetro de masas con una fuente de ionización por electrospray. Como espectrómetro de masas se utilizó

un híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo modelo 6520 (Agilent Technologies, España). Se inyectaron 2 µL de extracto metanólico a una columna de fase reversa (Zorbax SB-Aq 1.8 µm 2.1x50 mm, Agilent Technologies, España) equipada con una precolumna (Zorbax SB-C8 Rapid Resolution Cartridge 2.1x30 mm 3.5 µm, Agilent Technologies, España).

Referente a las condiciones del análisis, la temperatura de la columna se fijó a 60°C y el flujo a 0.6 mL/min. El solvente A fue agua con un 0.2% de ácido acético y el solvente B fue metanol con un 0.2% de ácido acético. Las condiciones empleadas para la separación por elución en gradiente de los metabolitos se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6 Condiciones de la elución en gradiente empleada para la separación de los analitos por cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución en la determinación del perfil metabolómico en orina y plasma.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
Inicio	98	2
1.00	98	2
13.00	2	98
19.00	2	98

El intervalo de tiempo entre análisis consecutivos fue de 5 min.

Operando en modo tiempo de vuelo, los datos se recogieron en modo positivo y negativo analizando en un rango entre 100 y 3,000 m/z. El voltaje capilar fue de 3,500 V, la velocidad de escaneo de 1 escaneo/min y el rango dinámico de 2 GHz. Como gas nebulizador se utilizó N₂ a un flujo de 5 L/min y una temperatura de 350°C. La calibración se efectuó continuamente con compuestos de referencia con una m/z de 121.050873 y 922.009798 en positivo y 119.036320 y 966.000725 en negativo. Finalmente, para la obtención de datos se utilizó el programario *MassHunter Data Acquisition* (Agilent Technologies, España).

IV.6 CÁLCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

IV.6.1 Digestibilidad, balance de nitrógeno y síntesis de proteína microbiana

IV.6.1.1 Excreción fecal

La excreción diaria de heces se calculó utilizando la siguiente ecuación (3):

$$(3): MSE = \frac{Q_{Cr}}{[Crh]}$$

Donde *MSE* es la excreción diaria de heces, *[Crh]* es la concentración del marcador externo en las heces y *Q_{Cr}* es la cantidad de marcador externo ingerida obtenida por la siguiente ecuación (4):

$$(4): Q_{Cr} = [Crc] * MSIc$$

Donde *Q_{Cr}* es la cantidad de marcador externo ingerida, *[Crc]* es la concentración de marcador externo en el concentrado y *MSIc* es la ingestión diaria de concentrado.

IV.6.1.2 Ingestión de forraje

La ingestión diaria de forraje se calculó utilizando la siguiente ecuación (5):

$$(5): MSIf = \frac{Q_{CIAh} - Q_{CIAc}}{[CIAf]}$$

Donde $MSIf$ es la ingestión diaria de forraje, Q_{CIAh} es la cantidad de marcador interno excretado por heces (calculado según la ecuación 6), Q_{CIAc} es la cantidad de marcador interno ingerido con el concentrado (calculado según la ecuación 7) y $[CIAf]$ es la concentración de marcador interno en el forraje.

$$(6): Q_{CIAh} = [CIAh] * MSE$$

Donde Q_{CIAh} es la cantidad de marcador interno excretada, $[CIAh]$ es la concentración de marcador interno en las heces y MSE es la excreción diaria de heces.

$$(7): Q_{CIAc} = [CIAc] * MSIC$$

Donde Q_{CIAc} es la cantidad de marcador interno ingerida en el concentrado, $[CIAc]$ es la concentración de marcador interno en el concentrado y $MSIC$ es la ingestión diaria de concentrado.

IV.6.1.3 Digestibilidad aparente

Por último, a partir de las estimaciones obtenidas en las ecuaciones 3 y 5, se calcularon las digestibilidades aparentes de los distintos nutrientes utilizando la ecuación que sigue (8):

$$(8): DigA(\%) = \frac{([Nc] * MSIC + [Nf] * MSIf) - ([Nh] * MSE)}{([Nc] * MSIC + [Nf] * MSIf)} * 100$$

Donde $DigA$ es la digestibilidad aparente de cada nutriente (%), $[Nc]$ es la concentración de cada nutriente en el concentrado (%), $MSIC$ es la ingestión de concentrado en el período de estudio, $[Nf]$ es la concentración de cada nutriente en el forraje (%), $MSIf$ es la ingestión de forraje en el período de estudio, $[Nh]$ es la concentración de cada nutriente en las heces (%) y MSE es la excreción de heces en el período de estudio.

IV.6.1.4 Nitrógeno digestible

La ingestión y excreción de N digestible se estimó por la diferencia entre el N total (ingerido y excretado) y el N ligado a la FND (ingerido y excretado) según lo propuesto por Van Soest (1994).

IV.6.1.5 Materia orgánica digestible

La ingestión de materia orgánica digestible (MOD) se estimó mediante el producto entre la MO ingerida y su valor de digestibilidad aparente.

IV.6.1.6 Masa proteica depositada

La masa proteica depositada se calculó según la ecuación (11) propuesta por Owens *et al.* (1995).

$$(11): MPD = 0.1718 * GMD - 0.0482$$

Donde *MPD* es la masa proteica depositada por los animales (kg/día) y *GMD* es la ganancia media diaria (kg/día).

IV.6.1.7 Excreción urinaria diaria

Las instalaciones de la granja experimental no permitían la recolección total de la excreción diaria de orina. Así, el volumen de orina fue estimado a partir de la concentración de creatinina en orina y el peso metabólico de los animales, asumiendo que los animales eliminan por orina 883 μmol de creatinina por kg de peso metabólico y día (Chen *et al.*, 1992).

La masa urinaria total se estimó considerando que la orina bovina tiene una densidad aproximada de 1.03 g/mL (Spanghero *et al.*, 2009).

IV.6.1.8 Tasa de filtración glomerular, urea filtrada y urea reabsorbida

La tasa de filtración glomerular (TFG) se calculó a partir de las concentraciones de creatinina en plasma y en orina según lo propuesto por Dipu *et al.* (2006).

La urea filtrada se estimó multiplicando la concentración de urea en plasma por la TFG. Finalmente, la diferencia entre la urea filtrada y el total de urea excretada en orina permite obtener la urea reabsorbida (López *et al.*, 2017).

IV.6.1.9 Aporte duodenal de bases púricas

El aporte duodenal de bases púricas se estimó a partir de la excreción urinaria de derivados púricos utilizando la ecuación (12) propuesta por Orellana Boero *et al.*, (2001).

$$(12)BP = \frac{DP - 235.8}{0.842}$$

Donde *BP* es el aporte duodenal de bases púricas ($\mu\text{mol/kg PV}^{0.75}$), *DP* es la excreción urinaria de derivados púricos ($\mu\text{mol/kg PV}^{0.75}$), 235.8 representa la excreción endógena de derivados púricos ($\mu\text{mol/kg PV}^{0.75}$) y 0.842 representa la tasa de recuperación de las bases púricas absorbidas en orina.

IV.6.1.10 Aporte duodenal de nitrógeno microbiano

El aporte duodenal de nitrógeno microbiano (NM) se estimó considerando que la relación bases púricas/NM en las bacterias asociadas a la fase líquida del rumen en animales recibiendo raciones concentradas es de 1.99 $\mu\text{mol/mg}$, según lo propuesto por Martín-Orúe *et al.* (1998).

IV.6.1.11 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de ingestión, excreción, digestibilidad, parámetros ruminales, balance de N, metabolitos en plasma y en orina, parámetros renales y síntesis de NM se realizó mediante un análisis de varianza (que incluía el tratamiento como un efecto con cuatro niveles [1-BP, 2-CTR, 3-AV, 4-VZ]) y un test Tukey de separación de medias, utilizando en ambos casos el software estadístico JMP® (2015). Los datos con una diferencia de más de 3 desviaciones típicas respecto a la media global fueron descartados del análisis estadístico.

IV.6.2 Metagenoma

IV.6.2.1 Normalización y filtrado del número de OTUs

Después de la asignación taxonómica fue necesario equilibrar el número de secuencias obtenidas en cada animal. Para ello, se normalizó el número de OTUs aplicando un factor de corrección obtenido al dividir la media de secuencias de cada animal por la media global. A continuación, el número de OTUs normalizado se redondeó a número entero y se eliminaron todos los OTUs que tenían 0 secuencias en todos los animales o sólo 1 secuencia en sólo un animal (en inglés, *singletons*).

IV.6.2.2 Análisis de integridad

La integridad de las secuencias se analizó utilizando el estimador *Good's*. Para ello se utilizó el número de OTUs normalizado y la función *coverage* del paquete *entropart* (Marcon y Herault, 2015) del software estadístico R Core Team (2017).

IV.6.2.3 Diagrama de Venn

Se construyó un diagrama de Venn, que cuantifica el número de OTUs (normalizado) únicos y compartidos entre tratamientos, con la función *draw.quad.venn* del paquete *VennDiagram* (Chen, 2016) del software estadístico R Core Team (2017).

IV.6.2.4 Análisis de coordenadas principales

Para el análisis de coordenadas principales (PCoA, del inglés *Principal Coordinate Analysis*) se utilizó el número de OTUs normalizado y con una transformación logarítmica. A continuación, se aplicó un índice de disimilitud a los datos estandarizados con la función *vegdist* (método *bray*), obteniendo así la distancia en la composición de OTUs de los distintos animales (paquete *vegan* [Oksanen *et al.*, 2017], software estadístico R Core Team [2017]). El PCoA se realizó utilizando la función *pcoa* del paquete *ape* (Paradis *et al.*, 2004) del software estadístico R Core Team (2017).

IV.6.2.5 Análisis de conglomerados

Para el análisis de conglomerados, se estandarizó el número de OTUs normalizado con la función *decostand* (método *hellinger*). A continuación, se aplicó un índice de disimilitud a los datos estandarizados con la función *vegdist* (método *bray*), obteniendo así la distancia en la composición de OTUs de los distintos animales. Los resultados obtenidos se representaron en un dendograma jerárquico con la función *hclust* (método *complete*). Todas las funciones descritas se encuentran en el paquete *vegan* (Oksanen *et al.*, 2017) del software estadístico R Core Team (2017).

IV.6.2.6 Análisis de similitud

Para el análisis de similitud (ANOSIM, del inglés *Analysis of Similarities*) se utilizó el número de OTUs normalizado y con una transformación logarítmica. A continuación, se aplicó un índice de disimilitud a los datos estandarizados con la función *vegdist* (método *bray*), obteniendo así la distancia en la composición de OTUs de los distintos animales. Finalmente, el ANOSIM se realizó utilizando la función *anosim*. Las funciones *vegdist* y *anosim* mencionadas en este apartado pertenecen al paquete *vegan* (Oksanen *et al.*, 2017) del software estadístico R Core Team (2017).

IV.6.2.7 Parámetros de valoración de la biodiversidad

Para calcular los índices de biodiversidad de Shannon y Simpson se utilizó la función *diversity* (índices *Shannon* y *Simpson* respectivamente) del paquete *vegan* (Oksanen *et al.*, 2017) del software estadístico R Core Team (2017). La riqueza de especies se computó utilizando la función *specnumber* del mismo paquete y software. Los tres cálculos se hicieron en base al número de OTUs normalizado.

IV.6.2.8 Análisis canónico de correspondencias

Se realizó un análisis canónico de correspondencias (CCA, del inglés *Canonical Correspondance Analysis*) que incluía, como variables ambientales, la concentración de urea en plasma, la concentración de N-NH₃ ruminal y las concentraciones de los AGV isobutírico y butírico en el rumen. El análisis se realizó a partir del número de OTUs normalizado y con una transformación logarítmica, utilizando la función *cca* del paquete *vegan* (Oksanen *et al.*, 2017) del software estadístico R Core Team (2017).

IV.6.2.9 Análisis de varianza

El análisis estadístico de los datos de diversidad, riqueza, abundancia de filos y arqueas y ratio Firmicutes/Bacteroidetes se realizó mediante un análisis de varianza (que incluía el tratamiento como un efecto con cuatro niveles [1-BP, 2-CTR, 3-AV, 4-VZ]) y un test Tukey de separación de medias, utilizando en ambos casos el software estadístico JMP® (2015).

IV.6.3 Metaboloma

Todos los cálculos, análisis y figuras descritos a continuación se realizaron con el programa Metaboanalyst 3.0 (Xia y Wishart, 2016). Sólo se incluyeron los datos de los análisis de orina y plasma por ionización positiva y negativa pertenecientes a los tratamientos 1-BP y 2-CTR.

IV.6.3.1 Estandarización y filtrado de los datos

Los datos relativos a la concentración de los distintos metabolitos detectados fueron estandarizados aplicándoles una transformación logarítmica y un *auto scaling* (los datos se corrigieron restando la media y dividiendo por la desviación estándar de cada variable).

De forma similar a lo realizado con los datos del metagenoma, se descartaron del análisis aquellos metabolitos con una concentración constante en todas las condiciones experimentales o sólo presentes en un animal.

IV.6.3.2 Análisis estadístico

Los datos estandarizados y filtrados fueron sometidos a un test no paramétrico mediante el test de Wilcoxon para detectar los “metabolitos significativamente diferenciales”, es decir, aquellos metabolitos que son distintos entre los animales de los dos tratamientos enfrentados.

Con los datos de los metabolitos significativamente diferenciales se realizó un análisis de enriquecimiento de sets de metabolitos (MSEA, del inglés *Metabolite Set Enrichment Analysis*) que permite, por un lado, clasificar los metabolitos hallados en su set de metabolitos correspondiente y, por otro lado, identificar qué sets de metabolitos se están expresando de forma diferencial entre grupos aplicando un algoritmo *global test* (Xia y Wishart, 2010). La página web también enlaza los diferentes sets de metabolitos con una breve descripción de la vía metabólica a la que pertenecen, procedente de la base de datos *Small Molecule Pathway Database* (Frolkis *et al.*, 2010).

A continuación, se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLSDA del inglés *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) con los datos de concentración de todos los metabolitos hallados (no sólo los diferenciales) estandarizados y filtrados.

IV.6.3.3 Mapa térmico

Se construyó un mapa térmico (en inglés, *heatmap*) utilizando los datos de los 25 metabolitos hallados como más explicativos de la variabilidad en un PLSDA sobre los metabolitos ya clasificados como diferenciales. Se utilizó el coeficiente de Pearson como medida de la distancia entre observaciones utilizando la información procedente de las concentraciones de metabolitos.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1 INGESTIÓN Y GANANCIA MEDIA DIARIA DURANTE EL PERÍODO DE CRECIMIENTO

Tabla 7 Ingestión media de concentrado y ganancia media diaria por tratamiento y período en terneros frisonos en fase de crecimiento (de 167 a 409.5 kg de peso vivo y de 122 a 272 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ). Se presentan también los errores estándar y la significación del efecto tratamiento.

Parámetro ¹	Tratamiento				Error estándar	P-valor
	1-BP	2-CTR	3-AV	4-VZ		
n	20	20	20	20		
Fase inicial (días 0-7)						
PV inicial (kg)	166.50 ^a	168.60 ^a	169.00 ^a	163.00 ^a	3.51	0.614
Ingestión de concentrado (kg MF/día)	6.5 ^{ab}	7.2 ^{ab}	7.9 ^a	5.1 ^b	0.60	0.011
Fase muestreo (días 33-40)						
PV muestreo (kg)	207.40 ^a	224.30 ^a	223.60 ^a	220.60 ^a	4.64	0.043
Ingestión de concentrado (kg MF/día)	5.90 ^a	6.20 ^a	5.90 ^a	5.70 ^a	0.16	0.123
Ingestión de concentrado acumulada (kg MF)	214.50 ^a	217.20 ^a	202.40 ^a	179.50 ^b	6.07	0.0001
Fase final (días 143-150)						
PV final (kg)	400.30 ^a	418.80 ^a	419.90 ^a	399.10 ^a	7.08	0.059
Ingestión de concentrado (kg MF/día)	9.60 ^{ab}	10.20 ^a	8.70 ^{ab}	8.10 ^b	0.47	0.009
Ingestión de concentrado acumulada (kg MF)	1,147.50 ^a	1,143.80 ^a	1,053.20 ^{ab}	977.20 ^b	26.01	<.0001
Crecimiento (días 0-150)						
GMD (kg/día)	1.36 ^{ab}	1.38 ^a	1.39 ^a	1.27 ^b	0.03	0.013
Ingestión de concentrado (kg MF/día)	7.65 ^a	7.63 ^a	7.02 ^b	6.51 ^c	0.173	<.0001
IC concentrado (MF)	4.92 ^a	4.59 ^a	4.21 ^b	4.15 ^b	0.10	<.0001
Ingestión de forraje ² (kg MF/día)	1.15	1.22	2.38	2.76		
Ingestión total ² (kg MF/día)	8.80	8.85	9.4	9.27		
Ingestión total ² (kg MS/día)	7.53	7.60	6.96	7.21		
IC total (MS)	5.54	5.51	5.01	5.68		

¹ PV: peso vivo; MF: materia fresca; GMD: ganancia media diaria; IC: índice de conversión.

² Se determinó la ingestión de forraje media por lote por lo que los datos no se pudieron analizar estadísticamente.

En la Tabla 7 se presentan la ingestión de alimentos y los ritmos de crecimiento a lo largo del período experimental. Al inicio del ensayo, los lotes se equilibraron por el PV ($P=0.614$). A los 33-40 días del inicio de la prueba, se apreciaron diferencias entre tratamientos ($P<0.05$) que tendieron a desaparecer al final del período de estudio ($P=0.059$).

La evolución de la ingestión de concentrado y el PV no mostraron el mismo patrón. Así, en las fases iniciales de la prueba, se apreciaron diferencias en el consumo de concentrado entre los lotes experimentales, siendo superior en los terneros que ingerían ensilado de avena (3-AV) como forraje que en aquellos que ingerían ensilado de veza (4-VZ) ($P<0.05$). Entre los días 33-40 de la fase de crecimiento, la ingestión media de concentrado se equilibró entre grupos ($P=0.123$) aunque las diferencias en el consumo acumulado se mantuvieron ($P<0.05$). En el último período, el más prolongado (días 40-150 de prueba), se registraron niveles de ingestión de concentrado inferiores en aquellos terneros que ingirieron la ración con ensilado de veza (4-VZ) que en aquellos que consumieron la ración control (2-CTR) ($P<0.05$). Con todo, los niveles de ingestión acumulada en el último período fueron superiores en los terneros que ingirieron concentrado y paja de cebada (1-BP y 2-CTR) que en los que consumieron concentrado y ensilado de veza (4-VZ) ($P<0.05$).

La ingestión de forraje estimada siguió un patrón inverso al consumo acumulado de concentrado. Aquellos animales con los menores registros en el consumo de concentrado mostraron las mayores ingestiones de forraje, con lo cual, la ingestión total acumulada se equilibró parcialmente entre grupos experimentales. Las diferencias en los ritmos de crecimiento no reflejaron los patrones de consumo y sólo se apreció que aquellos terneros que consumieron la ración mixta a base de concentrado y ensilado de veza (4-VZ) mostraron ritmos de crecimiento inferiores que los animales que consumían las raciones 2-CTR y 3-AV ($P<0.05$).

Al analizar los resultados presentados en la Tabla 7 hemos de considerar la incidencia de dos factores experimentales: por un lado, el nivel de PB (grupos 1-BP vs 2-CTR) y, por otro lado, el tipo de forraje y/o tipo de proteína que recibían los animales (grupos 2-CTR vs 3-AV vs 4-VZ).

En el primer caso, algunos autores han descrito una relación positiva entre ingestión de MS, GMD e ingestión proteica (Archibeque *et al.*, 2007a; Valkeners *et al.*, 2008) aunque en otros trabajos sólo se han observado diferencias en el consumo y no en el crecimiento (Cole *et al.*, 2006) o simplemente no se han detectado cambios en ninguno de los dos parámetros (Carrasco *et al.*, 2013). Nuestros resultados coinciden con los del último trabajo, puesto que no se detectaron diferencias ni en la ingestión total de MS ni en la GMD relacionados con el nivel de proteína de la ración (1-BP vs 2-CTR).

Respecto al segundo factor, en general, al incrementar el nivel de concentrado de una ración disminuye la ingestión de forraje, en una tasa de sustitución que varía en función de la calidad del forraje (McDonald *et al.*, 2010), lo que a nivel práctico implica un incremento de la ingestión de MS y, teóricamente, de la GMD (Caplis *et al.*, 2005). Nuestros resultados coincidirían con el

trabajo mencionado al comparar los grupos 2-CTR y 4-VZ pero no si comparamos 2-CTR con 3-AV; sin duda, la calidad del forraje puede explicar este comportamiento diferencial. En este sentido, en la Tabla 8 se presentan los niveles de ingestión y las digestibilidades de las raciones, que deberían ser índices fiables de la calidad del forraje. No obstante, hay que señalar que el balance de digestibilidad se realizó en un momento puntual del desarrollo de los animales (a los 224.5 kg de PV y 157 días de edad), por lo que es necesario tener en cuenta el proceso continuo que significa el desarrollo de los pre-estómagos, especialmente del compartimento retículo-ruminal, desde el lactante hasta el rumen adulto. El desarrollo de dichos compartimentos depende directamente de la ingestión de fibra y del establecimiento de una población microbiana en el retículo-rumen, puesto que se ha demostrado que el desarrollo de la pared y las papilas ruminales está estimulada por la producción/absorción de AGV (Van Soest, 1994). El hecho de que los animales fueran jóvenes y que estuvieran consumiendo distintas ratios de forraje/concentrado implica que no todos se encontraban en la misma fase de desarrollo ruminal; por lo que los datos presentados en la Tabla 8 deben ser tratados con precaución.

V.2 DIGESTIBILIDAD, PARÁMETROS RUMINALES, BALANCE DE NITRÓGENO Y SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA

El período experimental comprendió la fase de crecimiento completa, desde que los animales tenían 122 días de edad y 167 kg de PV hasta que alcanzaron los 272 días de edad y 409.5 kg de PV. Durante todo este período, se controlaron de forma automática el PV de los animales y su ingestión de concentrado en granja, datos que se recogen en la Tabla 7.

Entre 33-40 días después de haber iniciado el período experimental, cuando los animales contaban con 157 días de edad y 224.5 kg de PV aproximadamente, se realizó un muestreo puntual de líquido ruminal, sangre, heces y orina, así como de los forrajes y concentrados, para realizar un estudio de digestibilidad, parámetros ruminales, balance de N y síntesis de proteína microbiana. Los resultados de dicho estudio se presentan a continuación.

V.2.1 Ingestión, excreción y digestibilidad aparente de las raciones

En la Tabla 8 se presentan los valores medios registrados correspondientes a la ingestión de concentrado y forraje y también los valores de digestibilidad aparente de la MS, MO, PB y EE en terneros de 224.5 kg de PV y 157 días de edad tras 33-40 días de adaptación a los cuatro tratamientos o raciones experimentales.

Tabla 8 Valores medios de ingestión, excreción fecal y digestibilidad aparente por tratamiento obtenidos en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ). Se presentan también los errores estándar y la significación del efecto tratamiento.

Parámetro ¹	Tratamiento				Error estándar	P-valor
	1-BP	2-CTR	3-AV	4-VZ		
n	10	10	10	10		
Ingestión						
MS (kg/día)	5.38 ^b	6.21 ^{ab}	5.63 ^{ab}	6.36 ^a	0.258	0.0308
MS concentrado (kg/día)	5.03 ^{ab}	5.54 ^a	4.99 ^{ab}	4.86 ^b	0.175	0.0458
MS forraje (kg/día)	0.35 ^b	0.68 ^b	0.64 ^b	1.51 ^a	0.176	0.0003
MO (kg/día)	5.01 ^b	5.74 ^{ab}	5.27 ^{ab}	5.92 ^a	0.238	0.0378
MOD (kg/día)	2.82 ^c	3.64 ^{ab}	3.29 ^{bc}	4.20 ^a	0.202	0.0003
PB (g/día)	600.81 ^c	815.30 ^{ab}	754.76 ^b	946.96 ^a	37.818	<.0001
ND (g/día)	83.04 ^c	114.72 ^{ab}	108.22 ^b	131.36 ^a	5.095	<.0001
EE (g/día)	348.89 ^a	317.35 ^{ab}	294.10 ^b	295.42 ^b	11.267	0.0045
Excreción fecal						
MS (kg/día)	2.41 ^a	2.36 ^a	2.17 ^{ab}	1.95 ^b	0.106	0.0159
MO (kg/día)	2.18 ^a	2.09 ^{ab}	1.97 ^{ab}	1.72 ^b	0.099	0.0126
PB (g/día)	295.69 ^b	331.52 ^{ab}	317.74 ^{ab}	364.11 ^a	17.287	0.0570
ND (g/día)	33.72 ^a	39.07 ^a	38.09 ^a	42.40 ^a	2.437	0.1106
EE (g/día)	57.09 ^a	50.78 ^{ab}	62.06 ^a	33.38 ^b	5.483	0.0043
Digestibilidad aparente (%)						
MS	55.08 ^c	61.97 ^b	61.30 ^b	69.07 ^a	1.570	<.0001
MO	56.32 ^c	63.39 ^b	62.42 ^{bc}	70.69 ^a	1.613	<.0001
PB	50.69 ^b	59.26 ^a	57.87 ^a	61.54 ^a	1.100	<.0001
ND	59.26 ^b	65.88 ^a	64.85 ^a	68.07 ^a	1.080	<.0001
EE	83.38 ^{ab}	84.00 ^{ab}	78.89 ^b	88.79 ^a	1.691	0.0026

¹ MS: materia seca; MO: materia orgánica; MOD: materia orgánica digestible; PB: proteína bruta; ND: Nitrógeno digestible; EE: extracto etéreo.

En relación a la ingestión de concentrado, se registraron consumos máximos en los terneros adscritos al tratamiento 2-CTR, intermedios en los terneros de los grupos 1-BP y 3-AV y mínimos en los del grupo 4-VZ ($P < 0.05$). En el caso de la ingestión de forraje, fueron los terneros del grupo 4-VZ los que tuvieron un consumo superior al resto ($P < 0.05$). Respecto a la ingestión de MO, los animales del grupo 4-VZ mostraron un mayor consumo que aquellos que ingirieron la ración 1-BP ($P < 0.05$).

La mayor y menor ingestión de PB y nitrógeno digestible (ND) se registraron en los terneros que consumían, respectivamente, las raciones 4-VZ y 1-BP; mientras que los del grupo 3-AV mostraron niveles de consumo intermedios ($P < 0.05$). Los terneros adscritos al tratamiento 2-

CTR tuvieron consumos de PB y ND que no difirieron estadísticamente de los grupos que consumieron ensilado como forraje ($P>0.05$). Finalmente, la ingestión de EE fue superior en los terneros que ingirieron la ración 1-BP que en los que consumieron ensilado como forraje ($P<0.05$) debido a un mayor contenido de EE en el concentrado de baja proteína (Tabla 2).

Las menores excreciones de MS, MO y EE se registraron en los terneros del grupo 4-VZ. La excreción de PB tendió a ser superior al incrementar el contenido proteico de la ración ($P=0.0570$), alcanzando significación estadística al comparar los grupos 1-BP y 4-VZ ($P=0.0391$). Al contrario, la excreción de ND no difirió entre grupos ($P=0.1106$).

La tasa media de digestibilidad de la MS fue del 61.85% y estuvo modificada por el tratamiento experimental: las mayores tasas se observaron en los animales que consumieron la ración 4-VZ, las menores en los que consumieron la ración 1-BP mientras que los terneros que consumían las raciones 2-CTR y 3-AV mostraron tasas de digestibilidad intermedias (error estándar [ee]: 1.570; $P<0.05$). La relación positiva entre el aporte de PB y la digestibilidad de la MS ha sido descrito previamente por Archibeque *et al.* (2007b). No obstante, otros autores con protocolos similares no pudieron detectar diferencias en las tasas de digestibilidad (Valkeners *et al.*, 2008) o dichas tasas disminuyeron (Carrasco *et al.*, 2013) con el contenido proteico de la ración. La digestibilidad media de la MO fue del 63.20% y también se vio afectada por el tratamiento experimental, siendo superior en los animales del grupo 4-VZ, inferior en los del 1-BP e intermedia en los del 2-CTR (ee: 1.613; $P<0.05$). Las tasas medias de digestibilidad de la PB y del ND fueron 57.34% y 64.52% respectivamente, siendo inferiores en los animales del grupo 1-BP que en el resto (ee: 1.010 y 1.080 para PB y ND respectivamente, $P<0.05$ en ambos parámetros). La digestibilidad media del EE fue del 83.76%, siendo máxima en los animales del tratamiento 4-VZ, mínima en los del 3-AV e intermedia en los que consumían paja de cebada en la ración (ee: 1.691; $P<0.05$).

En la Tabla 8 se presenta también la ingestión diaria de MOD y en ella se aprecia como los terneros adscritos al grupo con un menor contenido de PB (1-BP) mostraron un menor consumo de MOD que aquellos que tuvieron una mayor ingestión proteica (4-VZ) ($P<0.05$). En este sentido, los datos confirmarían la relación entre una limitación proteica y una disminución del consumo de alimento que ha sido descrita previamente por otros autores (Sath *et al.*, 2012; de Oliveira Franco *et al.*, 2017).

Es cierto que, en el presente trabajo, los animales que consumieron raciones con un nivel proteico adecuado mostraron mayores niveles de ingestión de MOD, aunque el mayor consumo estuvo relacionado más con la ingestión de forraje que con la de concentrado. Dicho efecto se apreció en el caso del ensilado de leguminosas, mientras que en el caso del ensilado de gramíneas no fue tan evidente y los niveles de ingestión no se diferenciaron estadísticamente de los registrados en las raciones compuestas por pienso y paja de cebada. La elevada degradabilidad de las leguminosas (Salcedo-Díaz, 1998) podría compensar

parcialmente la depresión de la tasa de digestibilidad inducida por el resto de forrajes, al tener estos últimos un mayor contenido de lignocelulosa.

Las variaciones en las tasas de digestibilidad podrían estar inversamente relacionadas con el contenido lipídico de la ración. Efectivamente, la depresión que los lípidos ejercen sobre la digestibilidad y el crecimiento microbiano ha sido descrita previamente y estaría relacionada con la formación de una película lipídica que limitaría la degradación de la fibra (Brooks *et al.*, 1954; Ward *et al.*, 1957; Pfander *et al.*, 1957 en White *et al.*, 1958), reduciendo así la digestibilidad de la MS y su ingestión (Zinn y Shen, 1996; Górka *et al.*, 2015). No obstante, dicho efecto no se aprecia en la digestibilidad de la proteína (Górka *et al.*, 2015) o ácidos grasos, cuya digestibilidad puede incluso aumentar (Górka *et al.*, 2015; Hales *et al.*, 2017). En la presente prueba, el aporte de grasa en la ración no alcanzó los niveles limitantes (6.5% de la MS según FEDNA, 2008) pero la relación negativa entre grasa dietética y digestibilidad de la MS pudo ser apreciada.

En cualquier caso, cabe señalar que la medida de digestibilidad registrada no es una medida directa sino que dicha tasa ha sido estimada a partir de la utilización de dos marcadores: el Cr_2O_3 como marcador de la excreción fecal y las CIA como marcador interno indigestible. Si existiera un comportamiento diferencial en el marcador entre los dos componentes de la ración, dichas diferencias se reflejarían de forma artefactual en el coeficiente de digestibilidad. No obstante, los trabajos en los que se determina la consistencia de las CIA como marcador indigestible no apuntan en este sentido (Sales y Janssens, 2003).

V.2.2 Concentración ruminal de amoníaco y ácidos grasos volátiles

Tabla 9 Concentración de nitrógeno amoniacal, concentración y proporción de ácidos grasos volátiles y nivel de acidez ruminal por tratamiento obtenidos en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ). Se presentan también los errores estándar y la significación del efecto tratamiento.

Parámetro ¹	Tratamiento				Error estándar	P-valor
	1-BP	2-CTR	3-AV	4-VZ		
n	10	10	10	10		
Concentración de N-NH₃						
N-NH ₃ ruminal (mg/L)	0.58 ^b	4.15 ^b	9.41 ^b	29.86 ^a	2.590	<.0001
n	10	10	9	10		
pH	7.28 ^a	7.29 ^a	7.27 ^a	7.13 ^a	0.106	0.7000
Concentración de AGV						
AGV totales (mmol/L)	57.81 ^a	66.96 ^a	54.99 ^a	68.63 ^a	7.142	0.4584
Proporción de AGV						
Acético (%)	47.79 ^{bc}	46.30 ^c	50.73 ^{ab}	52.09 ^a	0.854	<.0001
Propiónico (%)	39.46 ^b	43.59 ^a	36.51 ^{bc}	35.49 ^c	0.977	<.0001
Butírico (%)	9.27 ^a	6.42 ^c	8.01 ^b	7.61 ^b	0.288	<.0001
Valérico (%)	2.16 ^a	2.19 ^a	2.76 ^a	3.15 ^a	0.306	0.0794
Isovalérico (%)	0.75 ^b	0.91 ^{ab}	1.24 ^a	0.96 ^{ab}	0.120	0.0509
Isobutírico (%)	0.56 ^b	0.59 ^{ab}	0.75 ^a	0.68 ^{ab}	0.041	0.0099
Ratio acético/propiónico	1.22 ^{bc}	1.07 ^c	1.42 ^{ab}	1.48 ^a	0.058	<.0001

¹ N-NH₃: nitrógeno amoniacal; AGV: ácidos grasos volátiles.

La concentración de N-NH₃ varió con el tipo de ración experimental, siendo superior en los animales adscritos en el tratamiento 4-VZ que en el resto (P<0.05). No se observaron diferencias significativas en los niveles de acidez ruminal ni en la concentración de AGV del líquido ruminal (P=0.7000 y P=0.4584 respectivamente) aunque sí se apreciaron variaciones en la proporción relativa de los distintos AGV. Así, la proporción de acético fue máxima en los terneros que ingerían la ración 4-VZ, mínima en aquellos que consumían la ración 2-CTR e intermedia en los grupos 1-BP y 3-AV (P<0.05). La proporción de ácido propiónico más alta y más baja se registraron en los tratamientos 2-CTR y 4-VZ respectivamente, hallándose proporciones intermedias en los terneros del grupo 1-BP (P<0.05). Consecuentemente, la tasa acético/propiónico fue máxima en los animales del tratamiento 4-VZ, intermedia en los tratamientos 1-BP y 3-AV y mínima en 2-CTR (P<0.05). La proporción de ácido butírico más alta se registró en los animales que consumían la ración 1-BP y la más baja en 2-CTR, habiendo valores intermedios en los animales que consumían las raciones con ensilados como forraje (3-AV y 4-VZ) (P<0.05). La proporción de ácido isobutírico fue mayor en los terneros del grupo 3-AV que en los de 1-BP (P<0.05). Las proporciones de los ácidos valérico e isovalérico

tendieron a ser superiores al incrementar la ingestión proteica de los animales ($P=0.0794$ y $P=0.0509$, respectivamente).

La composición del concentrado y las diferencias en la ingestión de PB se reflejaron en las concentraciones de $N-NH_3$. Al comparar únicamente los animales que recibieron ensilado como forraje, a pesar de la mayor degradabilidad de la proteína de la avena (Salcedo-Díaz, 1998; Abbeddou et al, 2011; Valderrama y Anrique, 2011), la concentración de $N-NH_3$ fue más alta en el grupo 4-VZ, dada la mayor ingestión de N en este último grupo de animales.

En ninguno de los tratamientos experimentales la concentración de $N-NH_3$ superó los 50 mg/L, valor propuesto como limitante para el crecimiento microbiano en vacuno (Satter y Slyter, 1974). Con ello, teóricamente, el crecimiento microbiano pudo haberse visto limitado. No obstante, la existencia de un nivel umbral de $N-NH_3$ para el crecimiento microbiano se ha puesto en entredicho dado que las necesidades de N degradable dependerán más del tipo de microbiota y de las condiciones de fermentación que se establezcan (Balcells, 1990). Resultados previos en terneras de raza Frisona recibiendo raciones con una elevada proporción de concentrado confirman los bajos niveles de $N-NH_3$ detectados en el presente trabajo y como dichos niveles, teóricamente limitantes de $N-NH_3$, no afectaron ni a la producción de proteína microbiana ni a los rendimientos productivos de los animales experimentales (Devant *et al.*, 2000).

En contraposición a las referencias bibliográficas consultadas (Murphy *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2004; Benchaar *et al.*, 2014), no se pudieron detectar cambios en el pH del líquido ruminal al incrementar la proporción de forraje de las raciones. Teóricamente, al reducir la proporción de concentrado, se reduciría la producción de AGV y del lactato, factores ambos que incidirían en la acidez ruminal (Hernández *et al.*, 2014). No obstante, los datos de pH registrados en nuestro estudio deben ser tratados con cierta precaución ya que fueron tomados exclusivamente de la fase líquida del rumen y en un único momento del día. Numerosos autores coinciden al describir menores concentraciones de AGV en la fase líquida que en el contenido ruminal completo, lo que determina que el pH pueda ser 0.7 puntos más elevado en la primera que en la segunda (Tafaj *et al.*, 2004; Ölschläger, 2007; Zebeli *et al.*, 2008d en Zebeli *et al.*, 2012). En nuestro caso, el líquido ruminal se obtuvo del saco ventral vía sonda esofágica, de forma que la mayor parte de la muestra procedió de la fase líquida. El uso de la sonda esofágica como medio de extracción tiene una elevada posibilidad de contaminación por saliva de la muestra, aunque para evitar dicha contaminación se descartó siempre la primera parte del líquido ruminal extraído. Se ha demostrado también que las variaciones de pH entre fases y entre momentos del día son más acentuadas en animales que consumen raciones concentradas, como es nuestro caso (Neubauer *et al.*, 2017); por todo ello, los datos de pH puntuales deben ser tratados con precaución. Además, el ingrediente mayoritario de los concentrados que consumieron los animales era el maíz (Tabla 2), cereal con una elevada proporción de endospermo córneo (denso y con una matriz proteica que envuelve los gránulos de almidón) que lo hace poco fermentable por la microbiota ruminal (FEDNA, 2010) y de

degradación lenta; por lo que es considerado un factor estabilizante del pH ruminal reduciendo el riesgo de acidosis (Balcells *et al.*, 2012).

La mayor ingestión de MOD registrada en los animales del grupo 4-VZ no se vio reflejada en un aumento de la producción total de AGV. Nuestros datos coinciden con los descritos por Benchaar *et al.* (2014), quienes tampoco observaron diferencias en las concentraciones de AGV en raciones mixtas modificando la relación forraje/concentrado (70/30 y 30/70) en bovino lechero. Sin duda, la concentración de AGV en el líquido ruminal responde a un equilibrio entre producción y absorción a través de la pared ruminal o tránsito a tramos distales del tracto gastrointestinal, por tanto, la ausencia de diferencias en la concentración ruminal de AGV no implica en ningún caso la ausencia de diferencias en su producción.

La proporción molar de ácido acético aumentó con el nivel de forraje de la ración mientras que la de ácido propiónico disminuyó, coincidiendo con los resultados de otros autores (Rodriguez *et al.*, 2004; Benchaar *et al.*, 2014). En consecuencia, la tasa acético/propiónico también fue mayor en los grupos que consumían ensilado de veza o avena como forraje. La variación de la proporción molar de ácido butírico no estuvo relacionada con la ratio forraje/concentrado de la ración; en este sentido la bibliografía consultada no es concluyente: ciertos autores describen una disminución de la proporción de ácido butírico con el nivel de forraje (Murphy *et al.*, 2000; Amat *et al.*, 2014) mientras que otros autores sugieren que dicha proporción resta inalterada (Benchaar *et al.*, 2014) o detectan modificaciones no relacionadas directamente con el nivel de forraje en la ración (Hernandez-Urdaneta *et al.*, 1976).

Las proporciones molares de los ácidos isobutírico, isovalérico y valérico están relacionadas con el nivel de proteína degradable de la ración, puesto que se originan a partir de la degradación aminoacídica (Russel y Hespell, 1981 en Muller, 1987). Los ácidos isobutírico e isovalérico se forman por desaminación oxidativa y descarboxilación de los aminoácidos valina y leucina (Allison y Bryant, 1963), mientras que el ácido valérico se produce por hidrólisis de un anillo y desaminación de la prolina (Dehority *et al.*, 1958). Los tres AGV de cadena ramificada actúan como factores de crecimiento, semi o esenciales, para la mayoría de poblaciones microbianas que participan en la degradación de la fibra (Yang, 2002). Utilizados como suplementos nutricionales, los AGV de cadena ramificada incrementan la degradación de la celulosa y la retención de N (en corderos en crecimiento recibiendo dietas purificadas [Cline *et al.*, 1966 en Muller, 1987]) o la ganancia media diaria (en terneros castrados alimentados con forrajes de mala calidad [Cook, 1984 en Muller, 1987]). Nuestros resultados coincidirían con los publicados por Carrasco *et al.* (2013) que describe un aumento de las proporciones molares de valérico e isovalérico con la ingestión de N, aunque dicho efecto no es siempre detectable (Valkeners *et al.*, 2008).

La lectura en el microscopio óptico de las muestras de líquido ruminal permitió detectar la presencia de protozoos solamente en los animales del grupo 4-VZ y en concentraciones muy variables entre ellos (150-470,000 células/mL); por lo que no se pudo analizar estadísticamente

la presencia de ciliados en dichos animales al estar más relacionada con la casuística de colonización que con las características de la ración.

V.2.3 Balance de nitrógeno

En la Tabla 10 se muestran los datos relativos a la ingestión, excreción y retención de N. También se detalla el parámetro N depositado, calculado a partir de la GMD de los animales según la ecuación propuesta por Owens *et al.* (1995) (apartado IV.6.1).

Tabla 10 Balance y deposición de N por tratamiento obtenidos en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ). Se presentan también los errores estándar y la significación del efecto tratamiento.

Parámetro ¹	Tratamiento ²				Error estándar	P-valor
	1-BP	2-CTR	3-AV	4-VZ		
n	10	10	9	10		
N ingerido (g/día)	96.13 ^c	130.45 ^{ab}	122.53 ^b	151.51 ^a	6.399	<.0001
N excretado						
Fecal (g/día)	47.31 ^b	53.04 ^{ab}	51.07 ^{ab}	58.26 ^a	2.954	0.0647
Urinario (g/día)	18.61 ^c	28.67 ^{bc}	36.45 ^{ab}	51.28 ^a	4.483	<.0001
N retenido (g/día)	30.21 ^a	48.73 ^a	35.00 ^a	41.98 ^a	5.602	0.0939
N depositado (g/día)	28.51 ^a	33.81 ^a	34.59 ^a	32.62 ^a	1.773	0.0735
N retenido (% N ingerido)	31.53 ^a	37.67 ^a	28.27 ^a	26.96 ^a	3.910	0.1979
N retenido (% N digerido)	62.07 ^a	62.97 ^a	47.95 ^a	43.30 ^a	6.253	0.0559
N retenido (g/g N depositado)	1.08 ^a	1.48 ^a	1.02 ^a	1.39 ^a	0.204	0.2710

¹ N: nitrógeno.

La ingestión de N fue máxima en el grupo de terneros que ingirieron la ración 4-VZ, media en el grupo 3-AV y mínima en el 1-BP, mostrando los terneros adscritos al tratamiento 2-CTR niveles de ingestión que no difirieron de aquellos registrados en los dos últimos grupos mencionados (P>0.05).

La excreción fecal de N tendió a ser superior al incrementar la ingestión del mismo (P=0.0647). La excreción urinaria de N fue máxima en los animales que consumían la ración 4-VZ, intermedia en los adscritos a los tratamientos 2-CTR y 3-AV y mínima en 1-BP (P<0.05). Las diferencias registradas en la excreción urinaria de N reflejaron aquellas registradas en la concentración ruminal de N-NH₃.

La retención y deposición absoluta de N tendieron a ser superiores en aquellos animales que recibían concentrado estándar en su ración (2-CTR, 3-AV, 4-VZ) (P=0.0939 y P=0.0735 respectivamente), mientras que la retención de N relativa al N digerido tendió a ser superior en

aquellos animales que recibían paja de cebada como forraje (1-BP, 2-CTR) ($P=0.0559$). Cabe mencionar que, si en lugar de separar las medias mediante el test tukey se utiliza un test t para comparar los tratamientos 1-BP y 2-CTR, se obtienen diferencias en su retención absoluta de N ($P=0.0188$) pero no en su retención relativa al N ingerido ($P=0.2502$) o digerido ($P=0.9154$). En cambio, los terneros del grupo 4-VZ tuvieron retenciones absolutas de N similares a los del grupo 2-CTR ($P=0.3751$) pero sus retenciones relativas al N ingerido y digerido fueron mucho más bajas ($P=0.0487$ y $P=0.0249$, respectivamente). De esta forma, se puede hipotetizar que las raciones que conformaban los tratamientos experimentales 1-BP y 2-CTR se podrían haber utilizado con el mismo nivel de eficiencia y que éste fuese inferior en la ración del grupo 4-VZ.

V.2.4 Concentraciones plasmática y urinaria y cinética de excreción renal de urea y creatinina

En la Tabla 11 se presentan las concentraciones plasmáticas de urea, creatinina y proteínas así como las concentraciones urinarias de urea, creatinina y N total, junto con los parámetros indicativos de la cinética de excreción renal. Las variaciones observadas en las concentraciones plasmática y urinaria de urea reflejan los niveles de ingestión de N (Tabla 10) igual que en el caso de las proteínas totales en plasma, cuya concentración fue mayor en los terneros que ingirieron la ración 4-VZ que en el resto ($P<0.05$).

La relación entre la ingestión de proteína y la concentración de urea en sangre y en orina ha sido descrita previamente (Archibeque *et al.*, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2009) y, si se considera además que las diferencias observadas en la concentración de $N-NH_3$ ruminal entre grupos siguieron un patrón idéntico a la excreción, podemos hipotetizar que el NH_3 que no fue incorporado al N microbiano, fue absorbido, metabolizado a urea (vía ciclo de la ornitina) y excretado en orina (Archibeque *et al.*, 2002).

Las referencias acerca de los efectos de la ración sobre la proporción de N ureico (N-ureico/N-total) en orina no son concluyentes: mientras que algunos trabajos han demostrado una relación positiva entre la proporción de N ureico en orina y el nivel de ingestión proteica en ovejas (McIntyre, 1970) y en vacas en lactación (Spek *et al.*, 2013); en otros trabajos dicha relación no se ha podido evidenciar (López *et al.*, 2017). En el mismo sentido, Archibeque *et al.* (2001) obtuvieron variaciones en la proporción de N ureico relativas al tipo de forraje ingerido, no relacionadas con el nivel de ingestión proteica sino con la presencia de factores anti-nutritivos en el forraje que, una vez metabolizados en el hígado, serían excretados vía orina incrementando así la fracción de N no ureico. En relación a nuestro estudio, las semillas de veza pueden ser tóxicas para los mamíferos debido, principalmente, a la presencia de los aminoácidos γ -glutamil- β -cianoalanina y β -cianoalanina, ambos con efecto neurotóxico (Ressler, 1964 en Megías *et al.*, 2014) por lo que se recomienda limitar su uso en monogástricos (niveles de inclusión máximos del 3-5% MF en pienso para cerdos y evitar su uso en piensos para pollos y gallinas [FEDNA, 2010]). En corderos, se ha demostrado que niveles de inclusión de semillas de veza del 25% (MF de la ración) pueden provocar

alteraciones en la estructura histológica del hígado sin afectar a la ingestión de MS, la GMD ni al índice de conversión (Gül *et al.*, 2003 en Huang *et al.*, 2017). Aunque la concentración de dichos factores anti-nutritivos en la ración 4-VZ fuese previsiblemente muy baja (al incorporar la planta entera como forraje en lugar de sus semillas), no hay que descartar su posible efecto sobre la proporción de N ureico en orina.

Tabla 11 Concentración plasmática y urinaria de urea y creatinina y cinética de excreción renal por tratamiento obtenidas en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ). Se presentan también los errores estándar y la significación del efecto tratamiento.

Parámetro ¹	Tratamiento				Error estándar	P-valor
	1-BP	2-CTR	3-AV	4-VZ		
Plasma						
n	10	10	9	9		
Urea (mg/L)	116.00 ^c	143.00 ^b	155.56 ^b	221.11 ^a	5.036	<.0001
Creatinina (mg/L)	9.61 ^{ab}	8.83 ^b	8.88 ^b	10.67 ^a	0.464	0.0258
Proteínas totales (g/L)	65.20 ^b	65.00 ^b	64.44 ^b	70.78 ^a	1.140	0.0010
Orina						
n	10	10	10	10		
Urea (g/L)	1.61 ^b	2.24 ^{ab}	1.80 ^b	2.62 ^a	0.181	0.0015
Creatinina (g/L)	0.71 ^{ab}	0.70 ^{ab}	0.56 ^b	0.82 ^a	0.041	0.0008
N-total (%)	0.17 ^b	0.24 ^b	0.31 ^b	0.53 ^a	0.051	<.0001
N-ureico/N-total (%)	46.19 ^a	50.40 ^a	30.86 ^{ab}	23.40 ^b	5.246	0.0023
Cinética de excreción renal						
n	10	9	9	9		
Excreción de orina (g/Kg PV ^{0.75} y día)	208.27 ^b	215.18 ^b	270.53 ^a	180.19 ^b	14.111	0.0008
Tasa de filtración glomerular (L/día)	594.44 ^a	681.64 ^a	670.69 ^a	586.03 ^a	43.874	0.2834
Filtración glomerular de urea (g/día)	68.87 ^b	97.59 ^{ab}	104.95 ^a	127.84 ^a	8.563	0.0002
Reabsorción tubular de urea (g/día)	51.45 ^b	70.72 ^b	77.94 ^{ab}	102.99 ^a	8.387	0.0011
Reabsorción tubular de urea (% urea filtrada)	75.30 ^a	72.16 ^a	73.88 ^a	79.44 ^a	2.186	0.1303
¹ N: nitrógeno						

Las concentraciones de creatinina se vieron afectadas por el tratamiento experimental, registrándose las mayores concentraciones en plasma y en urea en los animales del grupo 4-VZ (P<0.05). La creatinina es un producto de la degradación de la fosfocreatina muscular (González y Scheffer, 2002 en Costa-Silva *et al.*, 2012), por ello, *a priori*, su producción y excreción deberían reflejar la masa muscular o el PV de los animales y ser independientes del

tipo de ración. Señalar que las concentraciones plasmática y urinaria y la producción diaria de creatinina no tienen siempre una relación lineal, sino que dicha relación puede verse enmascarada por diversos factores, i.e. el volumen plasmático y/o urinario, la tasa de filtración glomerular, la reabsorción tubular (Cunningham, 2003).

Las concentraciones de proteínas plasmáticas coinciden con los valores previos publicados en la bibliografía: Erjaei *et al.* (2012) obtuvieron un rango de concentraciones que oscilaba entre 76.5-80 g/L (en terneros frisonos consumiendo raciones con un 15.5% de PB) y Kazemi-Bonchenari *et al.* (2017) entre 74.5-77 g/L (también en terneros frisonos con raciones del 14% de PB). Citar que la ingestión de PB en ambos trabajos se situó al mismo nivel que la registrada en los animales que consumían la ración 4-VZ, siendo la concentración de proteínas plasmáticas similar en los tres casos.

En la Tabla 11 se presentan también los valores relativos a la cinética de excreción renal de urea, apreciándose que los procesos de filtración glomerular y reabsorción tubular fueron mayores al incrementar el contenido proteico de la ración ($P < 0.05$ en ambos casos), por lo que la proporción de urea reabsorbida respecto a la filtrada no difirió entre tratamientos ($P = 0.1303$). Nuestros resultados difieren de los de López *et al.* (2017) quienes observaron que, al incrementar la ingestión proteica (incorporando torta de soja en una ración de corderos Hampshire) disminuía la reabsorción renal de urea, posiblemente debido a una sobreexpresión del gen del transportador de urea UT-A1 en aquellos animales con menores ingestiones proteicas (Starke *et al.*, 2012). Si bien es cierto que el gen que codifica dicho transportador puede sufrir una regulación tipo *feedback* por la concentración de urea en el fluido tubular (Sands, 1999; Kim *et al.*, 2005 en López *et al.*, 2017), es probable también que dicho factor no sea el único que regula las tasas de reabsorción/reciclaje de urea, justificándose así la ausencia de respuesta en nuestros resultados.

Finalmente, citar que las menores excreciones de orina se observaron en el grupo 4-VZ; no obstante, estos datos deben ser tratados con precaución dado que, por un problema técnico de la explotación, los animales estuvieron 10 horas sin agua; lo que sin duda afectó al volumen y *turnover* hídrico. Por este motivo, es difícil comparar nuestros resultados con aquellos que relacionan excreción de orina y tasa de filtración glomerular con los niveles de ingestión proteica (López *et al.*, 2017).

V.2.6 Síntesis de proteína microbiana en el rumen: excreción urinaria de derivados púricos

Tabla 12 Excreción urinaria de creatinina y derivados púricos y síntesis de nitrógeno microbiano en el rumen por tratamiento obtenidas en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ). Se presentan también los errores estándar y la significación del efecto tratamiento.

Parámetro ¹	Tratamiento				Error estándar	P-valor
	1-BP	2-CTR	3-AV	4-VZ		
Excreción de creatinina						
n	10	10	10	10		
Creatinina (mmol/día) ²	50.14 ^a	52.55 ^a	51.51 ^a	50.89 ^a	1.174	0.5262
Excreción de DP ³						
n	10	10	9	10		
Alantoína(mmol/día)	161.64 ^a	170.23 ^a	140.96 ^a	135.96 ^a	13.896	0.2270
Ácido úrico(mmol/día)	14.44 ^a	12.18 ^a	15.00 ^a	11.38 ^a	1.565	0.2784
DP (mmol/día)	176.08 ^a	182.41 ^a	155.96 ^a	147.34 ^a	13.661	0.2054
Tasa DP/creatinina	3.52 ^a	3.47 ^a	3.02 ^a	2.89 ^a	0.249	0.1674
NM (g/día)	97.10 ^a	100.49 ^a	84.86 ^a	79.82 ^a	8.087	0.2028
NM/MODR (g/kg)	34.66 ^a	27.76 ^{ab}	26.05 ^{ab}	19.55 ^b	2.669	0.0021
¹ PV: peso vivo; MP: masa proteica; DP: derivados púricos, NM: nitrógeno microbiano; MODR: materia orgánica digestible en el rumen.						
² Estimación obtenida considerando una excreción de creatinina constante de 883 µmol/kg de peso metabólico y día (apartado IV.6.1)						
³ Estimaciones obtenidas a partir del producto de la concentración de DP en orina y la excreción diaria de orina estimada.						

En la Tabla 12 se presentan los datos relativos a las estimaciones de las excreciones diarias de creatinina y DP, así como el nivel (g/día) y la eficiencia de síntesis microbiana (g/kg materia orgánica digestible en el rumen [MODR]).

No se apreciaron diferencias significativas en la excreción estimada diaria de creatinina (P=0.5348), ni en la de DP (P=0.2054), como tampoco en los niveles de síntesis microbiana (P=0.2028).

Como se citó previamente (apartado II.3.2), la estimación de la producción de NM en el rumen a partir de la excreción urinaria de DP es un método no invasivo que permite utilizar animales no alterados quirúrgicamente. No obstante, requiere la recolección completa de la orina de los animales, por lo que algunos autores (Chen *et al.*, 1992; Valadares *et al.*, 1999; Cetinkaya *et al.*, 2006 en Chizzoti *et al.*, 2008) han propuesto utilizar la concentración de creatinina en muestras puntuales de orina como marcador interno del volumen urinario. Estimado el volumen de orina y determinada la concentración de DP en las muestras puntuales, su puede calcular la

excreción diaria total de DP y, consecuentemente, estimar síntesis microbiana (Balcells *et al.*, 1991).

La excreción diaria de creatinina debería depender exclusivamente de la masa muscular y ser, por tanto, independiente del tipo de ración. No obstante, algunos autores sugieren que podría existir una relación entre ingestión proteica y excreción de creatinina (Van Niekerk *et al.*, 1963; Walker y Faichney, 1964; Leng *et al.*, 1994 en Dapoza *et al.*, 1999), aunque dicha relación no ha podido ser demostrada de forma concluyente en la literatura, ni en vacas en lactación (Kertz *et al.*, 1970), ni en terneros de cebo (Dinning *et al.*, 1949), ni en nuestro caso en terneros en crecimiento, como tampoco en ovejas gestantes o en lactación (Dapoza *et al.*, 1999). En todo caso, sí hay una coincidencia generalizada en que la fuente principal de error es la variabilidad individual (Walker y Faichney, 1964; Faichney *et al.*, 1995 en Dapoza *et al.*, 1999), entendida como las diferencias que pueden existir en la masa muscular y la concentración de fosfocreatina en el músculo entre animales. Considerando que nuestros terneros tuvieron una genética, sexo y PV similares, la variabilidad registrada (coeficiente de variación = 2.13%) correspondería a dos variables: el error individual como un componente relevante y el error relacionado con las variaciones circadianas en dicho parámetro (Chen *et al.*, 1992).

Las excreciones de DP observadas fueron superiores a las estimadas en otros trabajos de terneros en crecimiento, tanto en machos (Chen *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 2007; Cherdong et al., 2015) como en hembras (Devant *et al.*, 2000; Lascano y Heinrichs, 2011; Santana *et al.*, 2017). En este sentido, hay que tener en cuenta que todos los autores mencionados excepto Devant *et al.* (2000) utilizaron recolección completa de orina y no, como en nuestro caso, muestras puntuales, lo que supone una diferencia metodológica importante. En cualquier caso, la ausencia de un efecto claro de la ingestión de N sobre la excreción de DP coincide con las observaciones de Devant *et al.* (2000) (en terneras de 100 kg recibiendo raciones con un 13-17% de PB), de Lascano y Heinrichs (2011) (en terneras de 360 kg recibiendo raciones con un 12.5-15.5% de PB) y también de Cherdong *et al.* (2015) (en terneros de 90 kg recibiendo raciones con un 13-13.5% de PB). En contraposición, autores como Singh *et al.* (2007) y Santana *et al.* (2017) registran diferencias en la excreción de DP relacionadas con el nivel de ingestión de MO más que con el nivel de ingestión proteica.

La excreción diaria de DP nos permite estimar la producción diaria de NM y compararla con otros autores. Una de las revisiones más consistentes es la realizada por el ARC (1984) y en ella se estima una eficiencia media de síntesis de 32.1 g NM/kg MODR, considerando una tasa de digestibilidad de la MS en el rumen del 65%. No obstante, en la misma revisión se reducen dichas estimaciones para terneros en cebo alimentados con raciones concentradas a tasas muy inferiores: de 13.8 a 20 g NM/kg MODR. Nuestros valores se sitúan en este nivel: de 20 a 34 g NM/kg MODR. Por ello podemos afirmar que no hay una subestimación en los valores de síntesis obtenidos, ni que las bajas concentraciones de N-NH₃ (Tabla 9) limitaran el crecimiento microbiano. Es cierto que en las muestras ruminales, dada su naturaleza (obtenidas por sonda esofágica), pudo diluirse el N-NH₃ presente en el contenido ruminal y, por tanto, nuestras

observaciones podrían subestimar los valores reales. No obstante, sí existe una relación directa entre las concentraciones de N-NH₃ ruminal y su excreción urinaria, como un índice indirecto de un hipotético exceso de NH₃ en dicho compartimento. Si existe un exceso de N-NH₃ ello implicaría que la microbiota ruminal, en ciertas condiciones, puede crecer y desarrollarse con concentraciones de N-NH₃ muy inferiores a los 50 mg/L propuestos por Satter y Slyter (1974). Señalar, en este sentido, que las poblaciones bacterianas poseen varios mecanismos de incorporación de N-NH₃ que les permiten trabajar a diferentes concentraciones con diferentes eficiencias (Balcells, 1990). A pesar de la bondad de las estimaciones medias, no pudimos detectar diferencias en los niveles de síntesis relativas a la ingestión de N, con lo que coincidiríamos con Devant *et al.* (2000). No obstante, en la bibliografía sí se han observado variaciones en el proceso de síntesis con el nivel proteico de la ración (Martín-Orúe *et al.*, 2000; Lascano y Heinrichs, 2011), con el nivel de ingestión de MO (Santana *et al.*, 2017) y con el tipo de proteína del concentrado (Cherdong *et al.*, 2015).

V.3 METAGENOMA

V.3.1 Análisis de los resultados de secuenciación del ARN ribosómico

La secuenciación del ARNr de las muestras de líquido ruminal permitió obtener entre 31,749-31,871 secuencias por muestra que superaron el control de calidad, con un total de 1,273,085 secuencias en las 40 muestras analizadas. La longitud de las secuencias estuvo comprendida entre 35-301 bp.

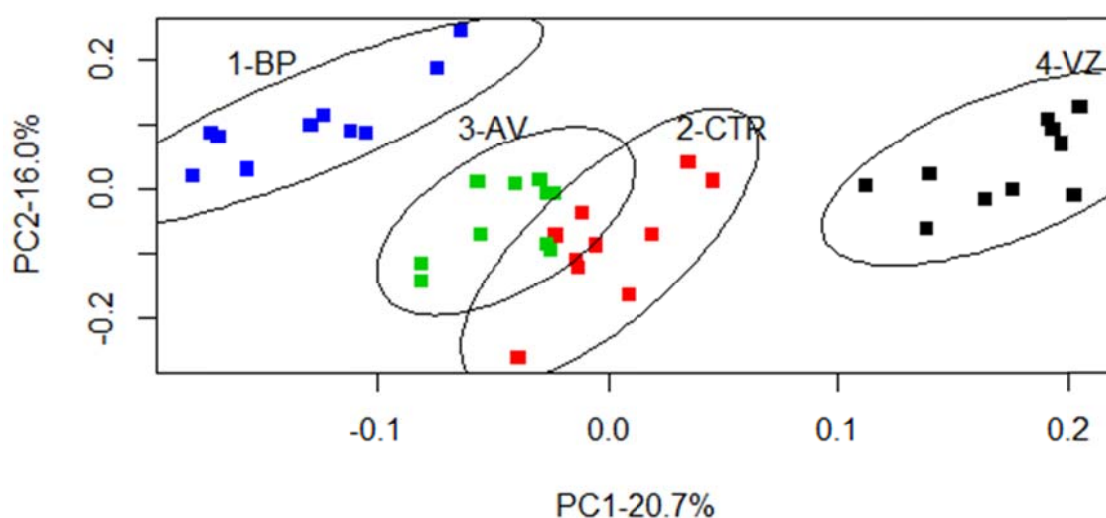
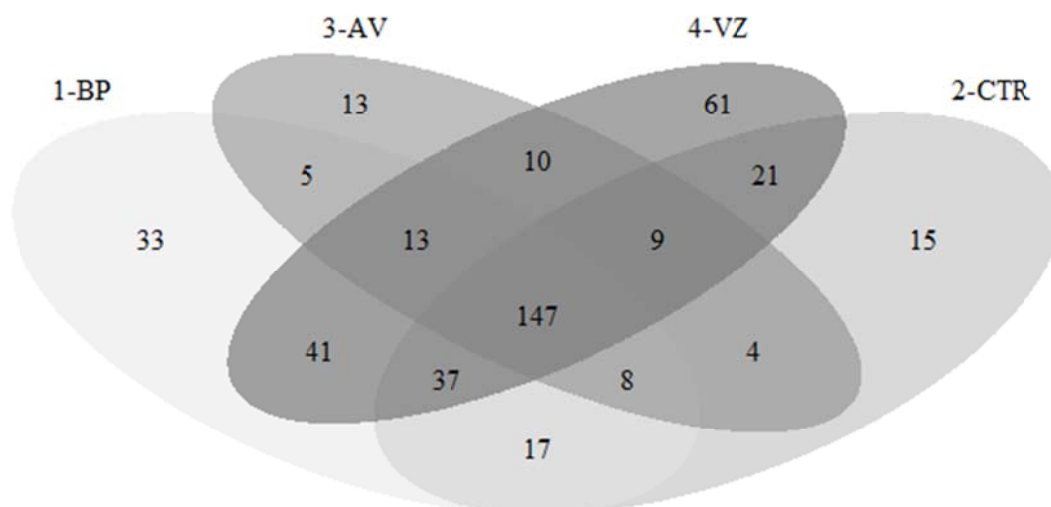
Las secuencias obtenidas se clasificaron en 434 OTUs, con un umbral de similitud del 98%. El promedio de OTUs obtenidos por muestra fue de 114, con un valor mínimo de 55 y máximo de 215.

La integridad de las secuencias se analizó utilizando el estimador *Good's* cuyo valor resultó del 99.9%, lo que indica que la mayoría de las especies bacterianas y de arqueas de las muestras fueron detectadas.

La asignación taxonómica de las secuencias permitió clasificar la microbiota detectada en 2 reinos, 12 filos, 23 clases, 50 órdenes, 93 familias y 193 géneros.

V.3.2 Comparación de la microbiota ruminal entre tratamientos

En la Figura 2 se presenta la distribución de los OTUs, mostrándose los comunes y los específicos aislados en los animales que consumieron cada ración o tratamiento experimental, según un diagrama de Venn (apartado IV.6.2.3). En el diagrama se aprecian 147 OTUs comunes, cifra que representa el 33.87% del total. A su vez, se encontraron 33 OTUs específicos del grupo 1-BP, 15 del grupo 2-CTR, 13 del grupo 3-AV y 61 del grupo 4-VZ, lo que representa un 10.96%, 5.81%, 6.22% y 17.99% del total de OTUs de los grupos 1-BP, 2-CTR, 3-AV y 4-VZ, respectivamente. Los tratamientos con un mayor número de OTUs en común fueron el 1-BP y el 4-VZ, los que menos compartieron fueron el 2-CTR y el 3-AV.



64

En la Figura 3 se muestra la representación gráfica del PCoA (apartado IV.6.2.4). Los puntos azules representan los animales del grupo 1-BP, los rojos 2-CTR, los verdes 3-AV y los negros 4-VZ. El gráfico se construyó a partir de las dos coordenadas principales más notorias obtenidas en el análisis, representadas en los ejes X e Y por orden de importancia. El porcentaje de las coordenadas principales representa la contribución relativa de esa coordenada a las diferencias entre animales, es decir, es el porcentaje de variación entre muestras o de información original que puede ser explicado por la coordenada. La distancia entre los puntos representa el grado de similitud entre la microbiota de los distintos animales: cuanto más cerca se hallen los puntos, más parecida es la estructura de la microbiota ruminal de los animales que representan.

El dendrograma (apartado IV.6.2.5) de la Figura 4 es la representación gráfica del análisis de conglomerados. Se aprecia que la microbiota ruminal de los animales adscritos a cada tratamiento experimental se agrupa en cinco conglomerados diferentes: uno exclusivo para las muestras del grupo 4-VZ, dos que agrupan las muestras de los animales del grupo 1-BP y dos en los que se mezclan las muestras de los grupos 2-CTR y 3-AV.

El PCoA (Figura 3) y el análisis de conglomerados (Figura 4) manifestaron que la composición de la microbiota ruminal de los animales fue modificada por el nivel de proteína de las raciones o tratamientos experimentales. Por un lado, la representación gráfica del PCoA (Figura 3) permite apreciar que los terneros con mayor y menor ingestión proteica (1-BP y 4-VZ) están claramente separados; mientras que los animales de los grupos 2-CTR y 3-AV, con niveles de ingestión proteica similares e intermedios, se encuentran juntos en una posición central. Por otro lado, el dendrograma (Figura 4) muestra que los terneros adscritos a los grupos 4-VZ y 1-BP se encuentran en conglomerados aislados, mientras que aquellos pertenecientes a 2-CTR y 3-AV se encuentran en clústeres comunes o cercanos.

De esta forma, podemos concluir que la estructura de la microbiota ruminal, en términos de composición y abundancia relativa de especies, difirió entre tratamientos experimentales según el nivel proteico de la ración: cuanto mayor fue la diferencia en el nivel de ingestión proteica de los animales, mayores fueron las diferencias en la estructura de su microbiota ruminal. No obstante, no podemos descartar el hecho de que otros factores pudieran haber influido, i.e. la concentración de FND o la degradabilidad de la proteína de la ración.

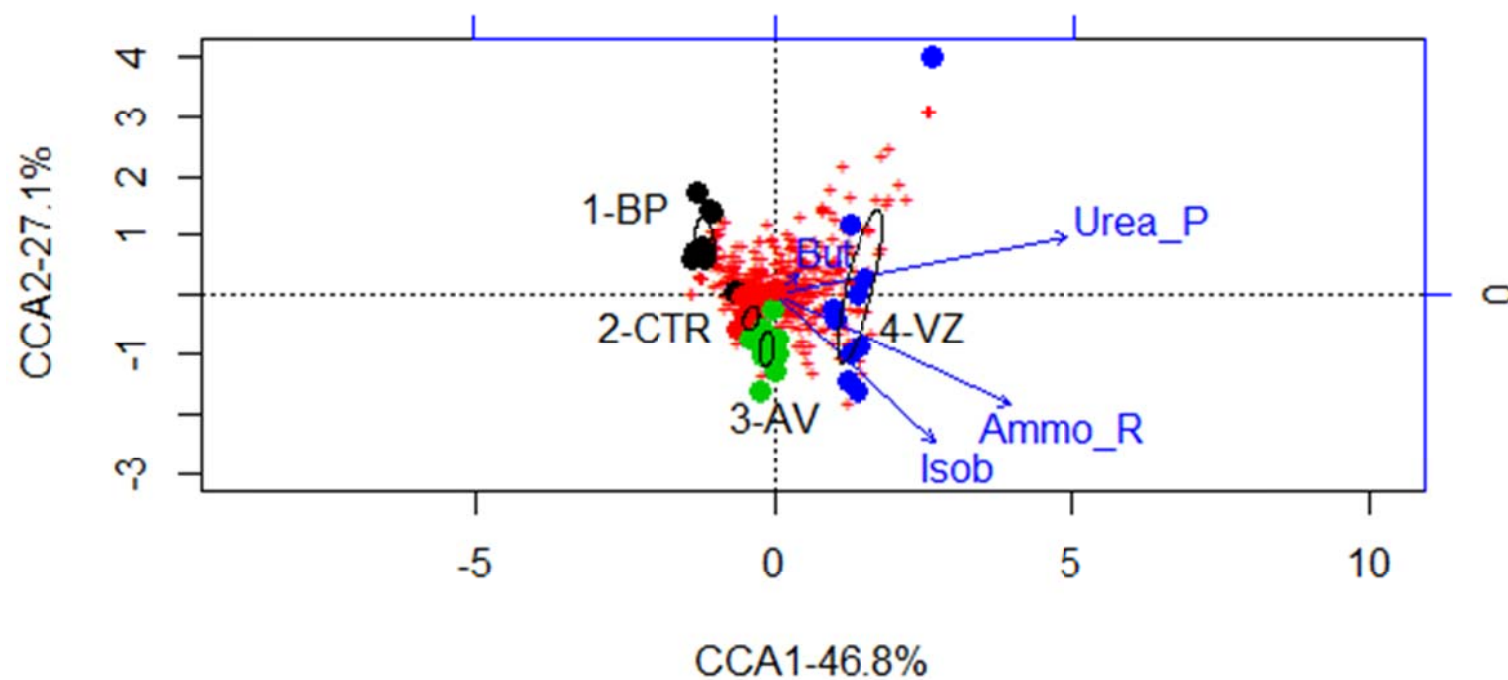


Figura 5 Representación gráfica del análisis canónico de correspondencias (CCA). Obtenido en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ).

La Figura 5 es la representación gráfica del CCA (apartado IV.6.2.8). Los puntos negros representan los animales del grupo 1-BP, los rojos 2-CTR, los verdes 3-AV y los azules 4-VZ. Para la realización del CCA, se incluyeron en el modelo las cuatro variables ambientales que describieron mejor las diferencias entre tratamientos en análisis previos: urea plasmática (Urea_P) y las concentraciones ruminales de N-NH₃ (Ammo_R) y los AGV isobutírico (Isob) y butírico (But); siendo Urea_P, Ammo_R y Isob las que mejor discriminaron la estructura de la microbiota de los animales que habían ingerido las diferentes raciones o tratamientos experimentales. La variabilidad explicada por dichas variables fue del 19.8%, confirmando la influencia de la ración sobre la microbiota, puesto que dos de las variables están directamente relacionadas con su contenido proteico (Urea_P y Ammo_R). El gráfico se construyó a partir de los dos componentes más notorios obtenidos en el análisis, representados en el eje X e Y por orden de importancia. El porcentaje de los componentes representa la contribución relativa de dicho componente a la variabilidad explicada por las variables ambientales. La distancia entre los puntos representa el grado de similitud entre la microbiota de los distintos animales.

V.3.3 Análisis de las diferencias de la microbiota ruminal entre tratamientos

La Figura 6 es la representación gráfica del ANOSIM (apartado IV.6.2.6). El valor de R tiene un rango de -1 a 1. Un valor de R próximo a 1 muestra que las diferencias entre grupos son mayores a las intra-grupo; un valor de R igual a 0 indica la ausencia de diferencias entre o *intra* y que la estructura de la microbiota ruminal responde al azar. El valor de P representa el nivel de confianza del análisis. El eje de abscisas representa la distancia entre muestras, es decir, las diferencias en la estructura de la microbiota ruminal entre los animales de un mismo grupo. El eje de ordenadas muestra los resultados de todos los grupos y sus diferencias. En nuestro caso, el valor de R fue próximo a 1 y el valor de P fue inferior a 0.05; por lo que el ANOSIM confirmó que las diferencias halladas en la estructura de la microbiota ruminal mediante los dos análisis anteriores eran significativas y que respondían al efecto del tratamiento experimental.

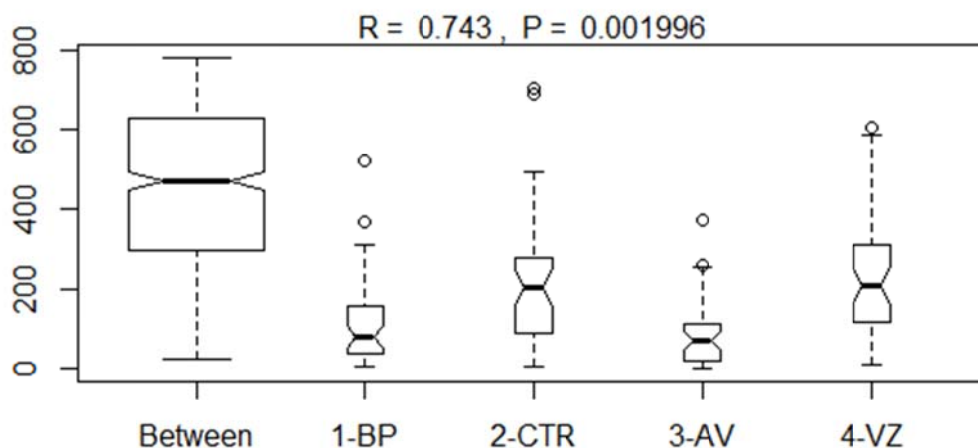


Figura 6 Representación gráfica del análisis de similitud (ANOSIM). Obtenido en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ).

Para confirmar las diferencias entre tratamientos y mostrar que los taxones microbianos más abundantes fueron afectados por el tratamiento experimental, se construyeron la Tabla 13 y la Figura 7. En la Tabla 13 se presenta la concentración relativa de los siete filos bacterianos más abundantes y la de arqueas. La Figura 7 es una representación gráfica de la concentración relativa de los 4 filos más abundantes.

Los dos filos más abundantes fueron *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. La mayor y menor abundancia relativa del filo *Bacteroidetes* se registró en los animales del grupo 2-CTR y 4-VZ respectivamente, hallándose valores intermedios en los grupos 1-BP y 3-AV ($P < 0.05$). En los animales del grupo 3-AV se encontraron mayores abundancias relativas de *Firmicutes* que en los del resto de grupos experimentales ($P < 0.05$). En este sentido, la ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* fue máxima en los animales del grupo 3-AV, intermedia en 4-VZ y mínima en 1-BP y 2-CTR ($P < 0.05$).

La abundancia de determinados filos y el tratamiento experimental estuvieron relacionados: la concentración de *Actinobacteria* fue máxima en los animales que consumieron la ración con baja proteína (1-BP); mientras que la concentración de *Fibrobacteres*, *Proteobacteria* y *Spirochaetes* fue superior en aquellos animales que ingirieron la ración experimental con mayor contenido proteico y mayor proporción de forraje (4-VZ) ($P < 0.05$ en todos los casos). El único filo en el que no se registraron diferencias entre tratamientos experimentales fue *Tenericutes*, que tuvo una concentración muy baja en todos los grupos (0.02-0.04%, $P = 0.3506$). Finalmente, la abundancia relativa de *Archaea* en el rumen fue máxima en el grupo 4-AV y mínima en el grupo 1-BP ($P < 0.05$).

Tabla 13 Abundancia relativa (%) de los siete filos principales y de las arqueas y parámetros de valoración de la diversidad microbiana por tratamiento obtenidos en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ). Se presentan también los errores estándar y la significación del efecto tratamiento.

Parámetro ¹	Tratamiento				Error estándar	P-valor
	1-BP	2-CTR	3-AV	4-VZ		
Abundancia relativa de filos y arqueas (%)						
<i>Bacteroidetes</i>	82.32 ^{ab}	85.60 ^a	77.09 ^{bc}	71.21 ^c	2.112	0.0002
<i>Firmicutes</i>	10.70 ^b	11.48 ^b	20.37 ^a	14.12 ^b	1.495	0.0002
<i>Actinobacteria</i>	6.45 ^a	2.37 ^b	1.71 ^b	1.37 ^b	0.754	<.0001
<i>Fibrobacteres</i>	0.04 ^b	0.12 ^b	0.34 ^b	11.64 ^a	1.003	<.0001
<i>Proteobacteria</i>	0.29 ^b	0.19 ^b	0.14 ^b	0.64 ^a	0.089	0.0015
<i>Spirochaetes</i>	0.00 ^b	0.01 ^b	0.03 ^b	0.70 ^a	0.143	0.0026
<i>Tenericutes</i>	0.04 ^a	0.03 ^a	0.04 ^a	0.02 ^a	0.007	0.3506
<i>Archaea</i>	0.15 ^b	0.18 ^{ab}	0.25 ^{ab}	0.29 ^a	0.030	0.0150
Valoración de la diversidad microbiana						
Ratio F/B	0.13 ^b	0.14 ^b	0.27 ^a	0.20 ^{ab}	0.024	0.0006
Índice de Shannon	1.71 ^a	1.03 ^b	1.52 ^a	1.71 ^a	0.110	0.0002
Índice de Simpson	0.64 ^a	0.34 ^b	0.54 ^a	0.63 ^a	0.041	<0.0001
Riqueza (nº OTUs/animal)	129.90 ^{ab}	101.40 ^{bc}	83.00 ^c	140.80 ^a	7.704	<0.0001

¹ F: Firmicutes; B: Bacteroidetes; OTUs: *operational taxonomic units*

En la Tabla 13 se presentan también los valores de los índices de diversidad de Shannon y Simpson, así como la riqueza de OTUs. Los índices de Shannon y Simpson fueron inferiores en el grupo 2-CTR que en el resto de tratamientos experimentales ($P < 0.05$). El número medio de OTUs por animal (expresado con el término “Riqueza”) fue más alto en los animales que recibían raciones experimentales con escasez y exceso de PB (1-BP y 4-VZ, respectivamente) que en aquellos asignados a tratamientos experimentales con ingestiones proteicas intermedias (2-CTR y 3-AV) ($P < 0.05$).

En la Figura 7 se presenta la concentración relativa de los cuatro filos predominantes en la microbiota de los terneros adscritos a cada tratamiento. El filo *Bacteroidetes* estuvo compuesto mayoritariamente por bacterias de la familia *Prevotellaceae* (99.8%) mientras que el 91% de las bacterias que formaban el filo *Firmicutes* pertenecían a cuatro familias: *Lachnospiraceae* (39%), *Veillonellaceae* (38.2%), *Lactobacillaceae* (7.3%) y *Ruminococcaceae* (6.5%). En el caso del filo *Actinobacteria*, el 94.5% de sus bacterias pertenecían a dos familias: *Bifidobacteriaceae* (52%) y *Atopobiaceae* (42.5%). Finalmente, los *Fibrobacteres* pertenecían totalmente a la familia *Fibrobacteraceae*.

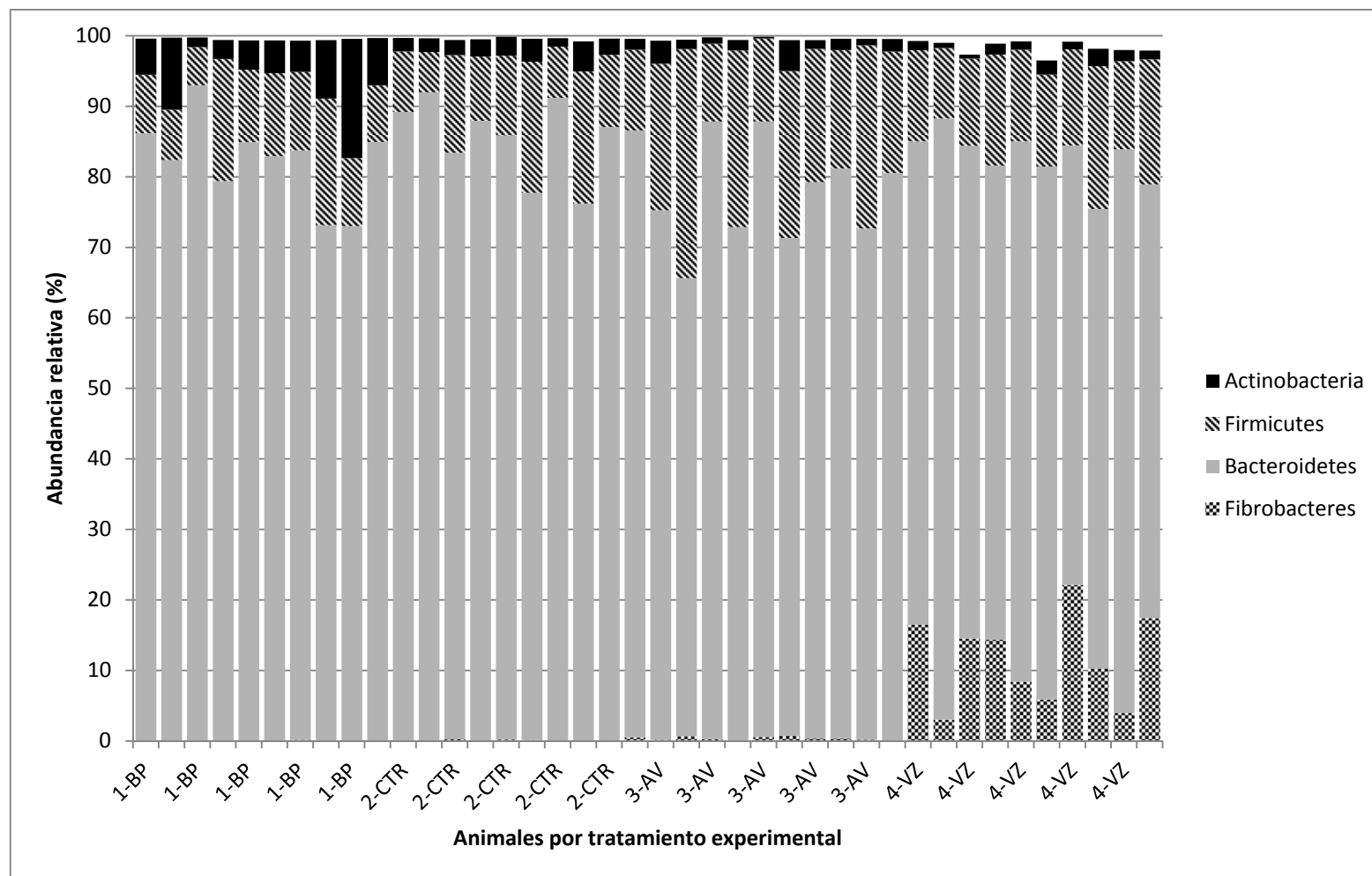


Figura 7 Representación gráfica de la concentración relativa (%) de los cuatro filos más abundantes por tratamiento experimental. Se representan los 10 animales por tratamiento experimental que fueron muestreados en el estudio. Obtenido en terneros frisones en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR) o sustituyendo, en el último tratamiento mencionado, la paja de cebada por ensilado de avena (3-AV) o por ensilado de veza (4-VZ).

V.3.4 Relación entre microbiota ruminal y tratamiento experimental

En el rumen existe un grupo de poblaciones microbianas ubicuas entre especies y hábitos alimentarios. Henderson *et al.* (2015) realizaron un meta-análisis del microbioma ruminal (742 animales de distintas especies y hábitos alimentarios) concluyendo que el 67.1% del material genético bacteriano podía ser clasificado en siete taxones presentes en todas las muestras (géneros *Prevotella*, *Butyrivibrio* y *Ruminococcus*, familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* u órdenes *Bacteroidales* y *Clostridiales*) y que el 74% de las secuencias de arqueas comunes en las muestras analizadas podían ser asignadas a las especies *Methanobrevibacter gottschalkii* y *Methanobrevibacter ruminantium*. En nuestro caso, alrededor de un 34% de los OTUs aislados fueron comunes en todos los tratamientos, hecho que confirma la existencia de un núcleo de especies microbianas comunes entre individuos y condiciones ambientales. Cabe señalar que el núcleo de poblaciones comunes es todavía superior entre animales omnívoros o carnívoros, ya que la microbiota de los animales con dichos hábitos alimentarios presenta una menor diversidad (Ley *et al.*, 2008).

La abundancia relativa de las poblaciones ubicuas así como la aparición de nuevas poblaciones están relacionadas con el hospedador y su alimentación (Henderson *et al.*, 2015). En este sentido, los efectos de la ración sobre la estructura de la microbiota ruminal ya han sido descritos en la literatura. Diversos autores describen un incremento de la diversidad bacteriana en el rumen de animales alimentados con raciones forrajeras (>65% de forraje) en terneros de engorde (Fernando *et al.*, 2010), en vacas lecheras (Belanche *et al.*, 2012; Tapio *et al.*, 2017), en ovejas (Ellison *et al.*, 2014) o también en bisontes americanos (Bergmann, 2017). En relación al efecto del contenido proteico de la ración sobre la estructura de la microbiota ruminal, Belanche *et al.* (2012) describieron una reducción en la concentración y diversidad de bacterias, arqueas, hongos y protozoos ruminales en vacas lecheras con una restricción proteica del 20%. Los autores mencionan que dicho efecto se redujo al incrementar el contenido de fibra de la ración, probablemente debido al establecimiento de una microbiota más abundante y diversa con mayor capacidad de adaptación. En nuestro estudio, aunque se combinaron los efectos nivel de forraje y proteína de la ración, las diferencias obtenidas entre tratamientos no confirmaron los estudios mencionados. Los animales del tratamiento experimental 1-BP, que tuvieron las ingestiones más bajas de proteína y forraje, presentaron niveles de diversidad similares a los de los animales del tratamiento 4-VZ (Tabla 13), que eran los que mostraron un mayor consumo de proteína y forraje.

En trabajos anteriores se ha descrito que dos filos bacterianos predominan en la microbiota ruminal: *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Stewart *et al.*, 1997; Wallace, 2008 en de Menezes *et al.*, 2011). Dicha predominancia se confirma en nuestros resultados aunque la ratio entre ambos (Tabla 13) fue menor que la descrita por autores como Fernando *et al.* (2010), quienes describieron tasas de 0.9 en raciones concentradas y 1.5 en raciones forrajeras.

El filo *Bacteroidetes* está constituido en su mayor parte por miembros de la familia *Prevotellaceae*, que se caracteriza por su capacidad de utilizar una amplia diversidad de sustratos, i.e. péptidos, proteínas, monosacáridos y polisacáridos (Miyazaki *et al.*, 1997; Matsui *et al.*, 2000; Purushe *et al.*, 2010 en Deusch *et al.*, 2017). Numerosos autores coinciden al describir un incremento de la abundancia relativa de *Bacteroidetes* con el nivel de inclusión de concentrado (Fernando *et al.*, 2010; Belanche *et al.*, 2012; Henderson *et al.*, 2015; Tapio *et al.*, 2017) lo que coincide con nuestros resultados, ya que la concentración de dicho filo fue aparentemente superior en aquellos animales que consumían una mayor cantidad de concentrado.

Las familias *Lachnospiraceae* y *Veillonellaceae* conformaron casi el 80% del filo *Firmicutes*. Dos de los géneros mayoritarios de la familia *Lachnospiraceae* son *Roseburia* y *Butyrivibrio*: *Roseburia* degrada el almidón y distintos azúcares sencillos (Duncan *et al.*, 2002), *Butyrivibrio* puede utilizar carbohidratos estructurales y no estructurales (Russell y Baldwin, 1978 en Fernando *et al.*, 2010) y ambos producen ácido butírico como catabolito final (Duncan *et al.*, 2002; Kopečný *et al.*, 2003). Dentro de la familia *Veillonellaceae* se incluyen los géneros *Megasphaera* y *Selenomonas*., ambos implicados en la degradación del ácido láctico y, por tanto, en la prevención de la acidosis ruminal (Russell y Baldwin, 1978; Counotte *et al.*, 1981 en Fernando *et al.*, 2010). Algunas referencias señalan un aumento de la abundancia relativa de *Firmicutes* al incrementar el nivel de concentrado de la ración (Bergmann, 2017), especialmente las poblaciones del género *Veillonellaceae* (Tapio *et al.*, 2017). No obstante, Fernando *et al.* (2010) describen una disminución de *Firmicutes* en el período de adaptación a raciones concentradas. En nuestro estudio, los títulos del filo *Firmicutes* no fueron alterados por el nivel de concentrado de la ración (Tabla 13), probablemente debido a la capacidad de dichas bacterias de utilizar una gran variedad de sustratos.

El filo *Actinobacteria* está compuesto principalmente por las familias *Bifidobacteriaceae* (52%) y *Atopobiaceae* (42.5%). La primera está íntegramente compuesta por *Bifidobacterium*, previamente identificado en el microbioma de animales consumiendo raciones concentradas dada su capacidad de fermentar el almidón produciendo ácido acético y láctico (Stewart *et al.*, 1997 en Hernandez *et al.*, 2008). Dicho género puede ser utilizado como probiótico en rumiantes dada su efectividad en el control de patógenos como bacterias gramnegativas y algunos hongos (Dicks y Botes, 2010; Gilliland, 1989 en Elghandour *et al.*, 2015); lo que ha permitido reducir, en algunas experiencias, los tratamientos con sustancias antibióticas en terneros lactantes (Krehbiel *et al.*, 2003 en Elghandour *et al.*, 2015). Además, se ha demostrado su implicación en el metabolismo lipídico del rumen en experiencias *in vitro* (Gorissen *et al.*, 2010) e *in vivo* (Park *et al.*, 2011), transformando los ácidos linoleico y α -linolenico a sus isómeros conjugados, con propiedades beneficiosas para la salud del hospedador (Suzuki *et al.*, 2001; Wahle *et al.*, 2004; Tricon *et al.*, 2005; Bhattacharya *et al.*, 2006, Tzuzuki y Kawakami, 2008 en Gorissen *et al.*, 2010). La familia *Atopobiaceae* está íntegramente compuesta por el género *Olsenella*: descrito como componente ubicuo del rumen

bovino (Dewhirst *et al.*, 2001 en Kraatz *et al.*, 2011), utiliza la mucina, posee una gran actividad peptidolítica y produce ácido láctico como catabolito final (Kraatz *et al.*, 2011). La abundancia relativa de *Olsenella* en el rumen incrementa con raciones concentradas (Zened *et al.*, 2013) y con la suplementación con ácido láurico (Hristov *et al.*, 2012), mientras que no se ve afectada por la suplementación con aceite de girasol (Zened *et al.*, 2013). Cabe mencionar que algunos estudios describen un incremento de la concentración de *Bifidobacterium* y *Olsenella* en la microbiota ruminal durante procesos de acidosis ruminal (Mao *et al.*, 2013; Petri *et al.*, 2013); lo que coincidiría con un mayor riesgo de acidosis de los terneros del grupo 1-BP, que mostraron las menores ingestiones de forraje (Tabla 8) y los mayores títulos de *Actinobacteria* (Tabla 13), aunque los valores de pH registrados no confirman dicha hipótesis (Tabla 9).

El filo *Fibrobacteres* está constituido por la familia *Fibrobacteraceae*, que se caracteriza por su actividad celulolítica, pudiendo utilizar también la hemicelulosa y la glucosa (Hungate, 1950; Puniya *et al.*, 2015 en Deusch *et al.*, 2017). En el presente estudio, el filo *Fibrobacteres* fue más abundante en el microbioma ruminal de los animales que consumían un mayor porcentaje de forraje en la ración (Tabla 13), lo que coincide con la literatura disponible (Fernando *et al.*, 2010; Belanche *et al.*, 2012; Tapio *et al.*, 2017).

El filo *Spirochaetes* está compuesto íntegramente por bacterias del género *Treponema*. Su principal componente, *Treponema bryantii*, actúa en simbiosis con bacterias celulolíticas utilizando azúcares procedentes de la degradación de la celulosa (Stanton y Canale-Parola, 1980), lo que explica su mayor abundancia en el microbioma de los animales del tratamiento 4-VZ, que consumían el mayor porcentaje de forraje (Tabla 13).

El filo *Proteobacteria* está compuesto, entre otras, por bacterias de la familia *Moraxellaceae* (49.9%), dentro de la cual el género *Psychrobacter* es uno de los más abundantes. *Psychrobacter* ha sido aislado en el tracto gastrointestinal del salmón (Ringø *et al.*, 2008) y del cerdo (Koh *et al.*, 2015) y se ha utilizado como probiótico, dado la mejora que induce en la eficiencia de utilización del alimento y la respuesta inmune (Sun *et al.*, 2011 en un estudio con *Epinephelus coioides*). No existen referencias relativas a la influencia de la ración sobre la abundancia de *Proteobacteria*, por lo que es difícil justificar la mayor concentración de dicho filo observada en la microbiota de los terneros con mayores consumos de PB y forraje (Tabla 13).

El rol de las bacterias del filo *Tenericutes* en el rumen es todavía desconocido, al igual que las especies que lo componen (Deusch *et al.*, 2017). En nuestro estudio, dicha población fue escasa (0.02-0.04% de la microbiota total) y en ningún caso se vio afectada por el tratamiento experimental (Tabla 13).

De nuestros resultados se puede deducir que el nivel y el tipo de carbohidrato de la ración es un factor crucial en las variaciones registradas en la estructura de la microbiota ruminal. No obstante, la abundancia relativa de *Prevotellaceae* (filo *Bacteroidetes*) y *Olsenella* (familia *Atopobioaceae*, filo *Actinobacteria*), dos poblaciones bacterianas con actividad peptidolítica, fue mayor en el microbioma ruminal de los animales asignados al tratamiento baja proteína (1-BP).

Este efecto no coincide con los resultados de Belanche *et al.*, (2012), quienes demostraron el efecto contrario. Es por ello que, a partir de nuestros resultados, podríamos sugerir que un aumento en las poblaciones bacterianas capaces de degradar la proteína no está únicamente relacionado con un incremento en el aporte de proteína sino que, ante la escasez de fuentes nitrogenadas, se produciría un aumento de los títulos de dichas poblaciones como mecanismo para optimizar su aprovechamiento o eficiencia de utilización.

Dentro del reino *Archaea*, el género *Methanobrevibacter* fue el integrante mayoritario (99.2%), coincidiendo con la mayor parte de la literatura consultada. *Methanobrevibacter* es estrictamente anaerobio e hidrogenotrófico, caracterizándose por su capacidad de producir CH₄ a partir de H₂, CO₂ y formiato (Leahy *et al.*, 2013). Las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas utilizan para su propio metabolismo energético el H₂ producido por el resto de poblaciones microbianas del rumen (principalmente bacterias y protozoos) en un proceso llamado transferencia interespecífica de H₂ (Wolin *et al.*, 1997 en Morgavi *et al.*, 2010). Dicha relación sintrófica es especialmente importante entre protozoos y arqueas (Belanche *et al.*, 2014) y entre bacterias celulolíticas del género *Ruminococcus* y arqueas (Wolin *et al.*, 1997; Latham y Wolin, 1977 en Morgavi *et al.*, 2010). Los protozoos sirven de hospedadores de las arqueas y evitan su contacto con posibles trazas de O₂ en el rumen (Morgavi *et al.*, 2010). Por su parte, las bacterias del género *Ruminococcus* producen H₂ como principal producto de fermentación de la fibra (Morgavi *et al.*, 2010). Las mencionadas interacciones quedaron demostradas en el trabajo de Belanche *et al.* (2012), quienes demostraron incrementos concomitantes de la abundancia de protozoos, *Ruminococcus albus* y arqueas metanogénicas en el rumen. De forma menos específica, Fernando *et al.* (2010) y de Menezes *et al.* (2011) registraron mayores abundancias relativas de arqueas al incrementar el porcentaje de fibra de la ración. Nuestros resultados coinciden con los autores mencionados ya que la mayor abundancia de arqueas se registró en la microbiota ruminal de los animales del grupo 4-VZ, el único tratamiento en el que se detectó la presencia de protozoos y en el cual se registraron las máximas ingestiones de forraje. La baja abundancia relativa de arqueas registrada en el tratamiento 1-BP coincide con las observaciones de Belanche *et al.* (2012), que sugirieron que las arqueas pueden ser sensibles a un déficit proteico en la ración.

V.4 METABOLOMA

Los resultados que se presentan a continuación son un esbozo del análisis del perfil metabolómico, aún en marcha, de los animales adscritos a los tratamientos 1-BP y 2-CTR y aque, inicialmente, se priorizó justificar el efecto del nivel de proteína de la ración sobre el metaboloma por encima del efecto del tipo de proteína. Los datos obtenidos en el análisis de las muestras de los animales adscritos a los tratamientos 3-AV y 4-VZ se procesarán con posterioridad.

La determinación del perfil metabolómico en orina y en plasma de los animales de los tratamientos 1-BP y 2-CTR permitió detectar más de 3,000 metabolitos, de los cuales unos 300 eran diferenciales entre los dos grupos. En la Tabla 14 se detallan los metabolitos totales y diferenciales hallados por ionización negativa y positiva en las muestras de orina y plasma.

Tabla 14 Suma de los metabolitos detectados en los tratamientos 1-BP y 2-CTR y suma de los metabolitos clasificados como diferenciales entre los tratamientos 1-BP y 2-CTR mediante un test de Wilcoxon obtenidos en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR).

Parámetro	Metabolitos detectados	Metabolitos diferenciales
Orina (ionización negativa)	1555	139
Orina (ionización positiva)	1075	120
Plasma (ionización negativa)	171	31
Plasma (ionización positiva)	412	20

En las Figuras 8 y 9 se representan gráficamente los PLSDA (apartado IV.6.3.2) realizados en base al total de metabolitos detectados en orina y en plasma por ionización negativa y positiva. Los triángulos representan los animales del tratamiento 1-BP y las cruces representan los animales del tratamiento 2-CTR. El gráfico se construyó a partir de los dos componentes más notorios obtenidos en el análisis, representados en los ejes X e Y por orden de importancia. El porcentaje de los componentes representa la contribución relativa de ese componente a las diferencias entre tratamientos, es decir, es el porcentaje de variación entre muestras que puede ser explicado por el componente. La distancia entre los puntos representa el grado de similitud entre el metaboloma de los distintos animales: cuanto más cerca se hallen los puntos, más parecido es el metaboloma de los animales que representan.

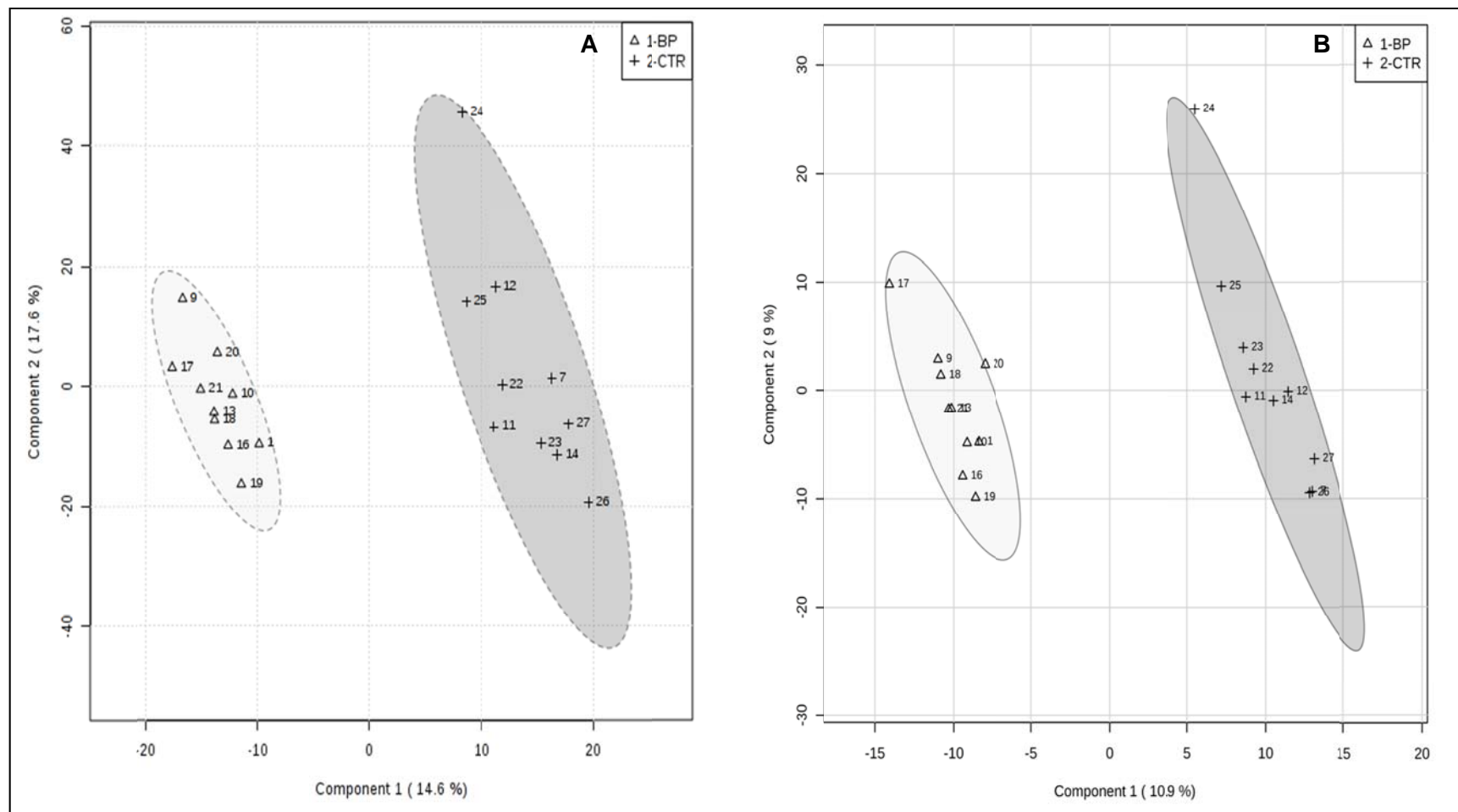


Figura 8 Representación gráfica del análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLSDA) realizado en base al total de metabolitos detectados en orina por ionización negativa (A) y positiva (B). Obtenido en terneros frisones en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR).

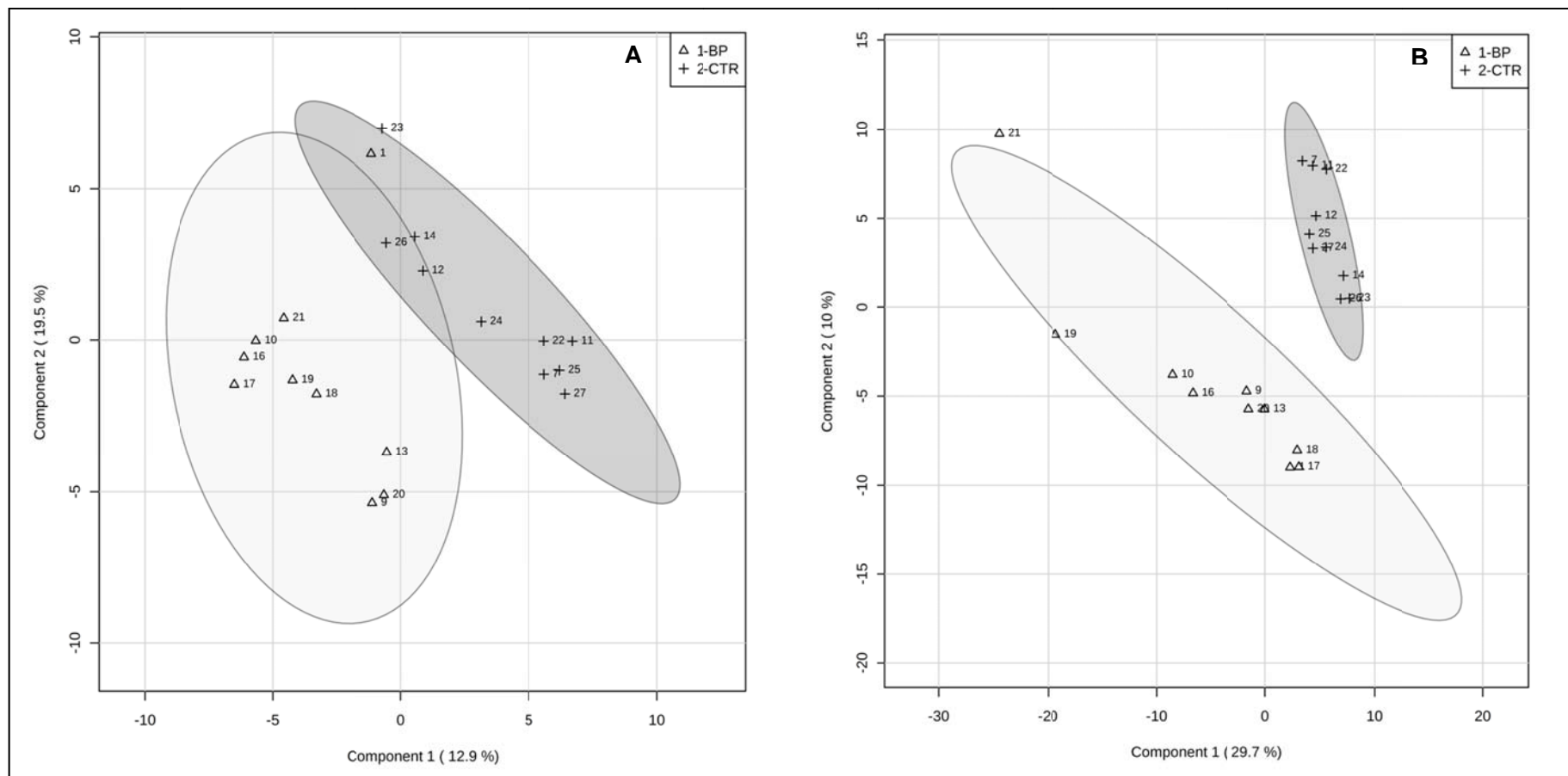


Figura 9 Representación gráfica del análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLSDA) realizado en base al total de metabolitos detectados en plasma por ionización negativa (A) y positiva (B). Obtenido en terneros frisones en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR).

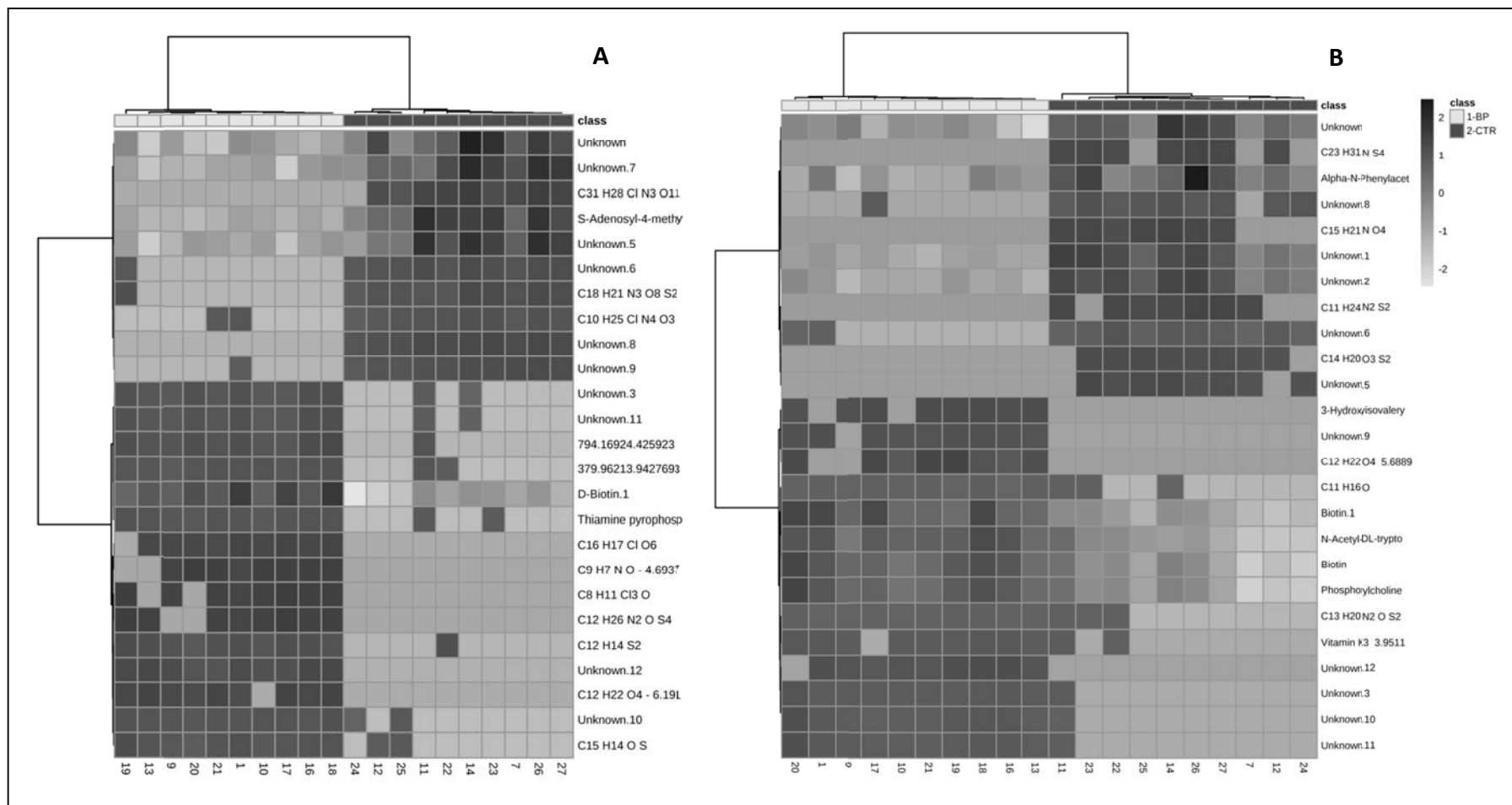


Figura 10 Mapa térmico de los 25 metabolitos más diferenciales hallados en orina por ionización negativa (A) y positiva (B). Obtenido en terneros frisones en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR).

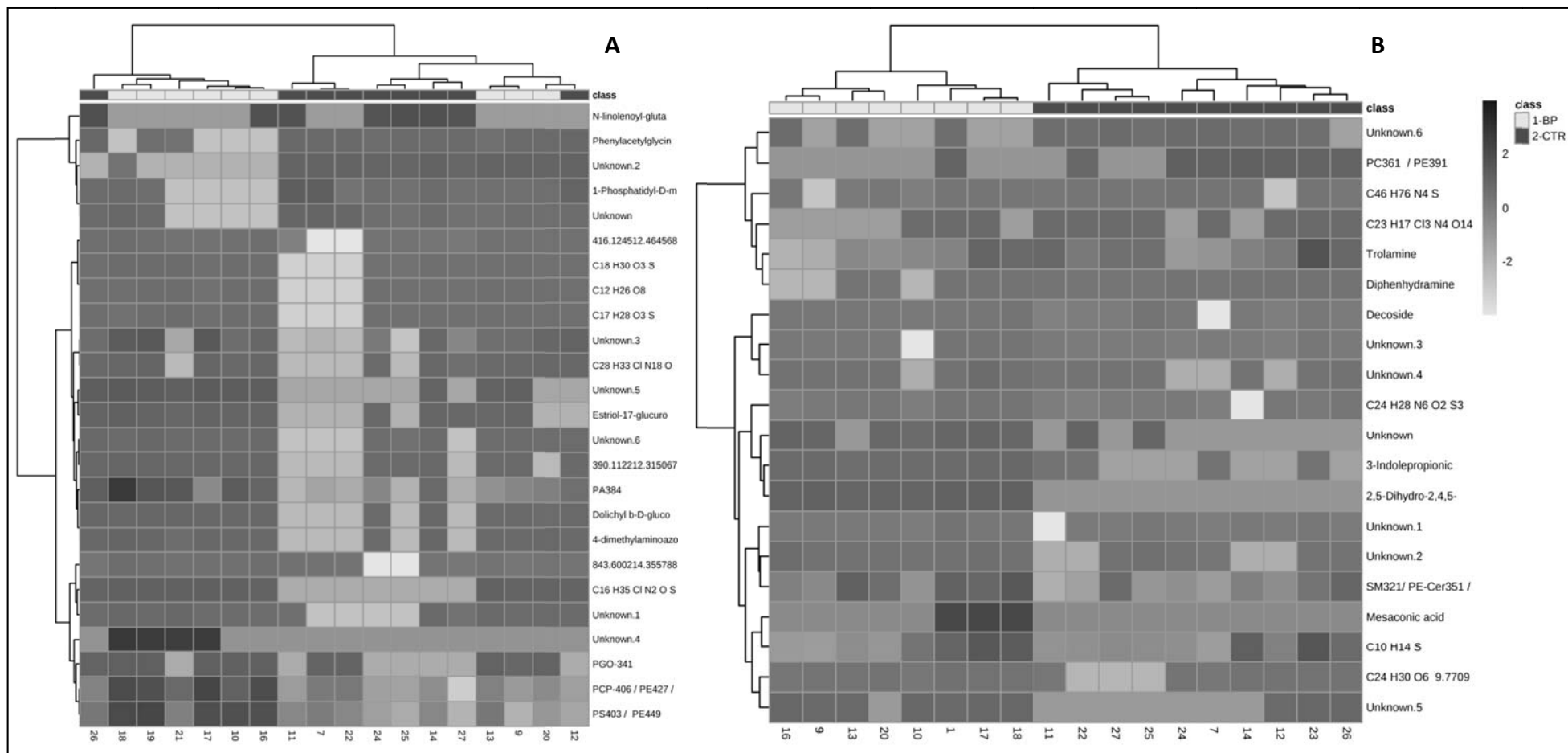


Figura 11 Mapa térmico de los 25 metabolitos más diferenciales hallados en plasma por ionización negativa (A) y positiva (B). Obtenido en terneros frisonos en fase de crecimiento (224.5 kg de peso vivo y 157 días de edad) recibiendo raciones mixtas compuestas por concentrado y paja de cebada a dos niveles de proteína bruta: baja (10% sobre materia fresca: 1-BP) o control (12% sobre materia fresca: 2-CTR).

Los mapas térmicos (apartado IV.6.3.3) de las Figuras 10 y 11 recogen los 25 metabolitos hallados como más discriminantes entre las muestras de los tratamientos 1-BP y 2-CTR, en un PLSDA realizado sobre los metabolitos previamente clasificados como diferenciales en un test de Wilcoxon (Tabla 14). En las etiquetas de fila aparece el nombre del metabolito, su fórmula química o, en defecto de ambos, la categoría *Unknown*. En la parte inferior de las columnas aparece la identificación de todos los animales muestreados. En la parte izquierda y superior de las figuras aparece un dendrograma que representa la clasificación en conglomerados de los metabolitos hallados y de los animales muestreados (según su perfil metabolómico), respectivamente. El color de las casillas del mapa térmico representa la abundancia de cada metabolito en relación a la del resto de animales después del proceso de normalización.

Los análisis preliminares de los datos de concentración de metabolitos de los animales de los tratamientos 1-BP y 2-CTR indicaron que la ración ejerce un efecto sobre el perfil metabolómico de los animales, siendo dicho efecto más pronunciado en la orina que en el plasma probablemente debido a que los metabolitos pueden regularse mejor en el segundo de los compartimentos. Dicho fenómeno ya ha sido observado en cerdos consumiendo raciones con distintos tipos de fibra (grano entero vs. harina refinada) por Bertram *et al.* (2006) y Nørskov *et al.* (2013). La futura identificación de los metabolitos hallados permitirá conocer las vías metabólicas que están activas en los animales de los dos tratamientos experimentales y, de esta manera, comprender mejor los cambios en el metabolismo provocados por distintas ingestiones de proteína en la ración.

VI. CONCLUSIONES

A partir de los resultados del presente trabajo, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. En el período inicial de la fase de crecimiento, desde los 122 a los 157 días de edad, la reducción del nivel de PB de la ración (del 12% al 10% MF) disminuyó los niveles de ingestión y las tasas de digestibilidad de la mayoría de nutrientes, así como la GMD. No obstante, al final de la fase de crecimiento (272 días) estas diferencias se compensaron y se igualó el PV entre los animales que habían ingerido los diferentes niveles de proteína.

En el mencionado período, la reducción del nivel de PB de la ración también redujo significativamente la excreción de N urinario y tendió a disminuir los niveles de retención y deposición de N en aquellos terneros adscritos a las raciones con una menor proporción de proteína.

2. El ensilado de avena mostró el mejor comportamiento nutritivo como forraje alternativo a la paja de cereales, al disminuir la ingestión de concentrado sin alterar los rendimientos productivos de los animales. No obstante, la utilización de ensilado de veza como forraje alternativo sí penalizó los rendimientos productivos de los terneros.
3. La disminución del nivel de PB (del 12% al 10% MF) y el incremento de la inclusión de forraje (6%, 12% y 24% MF) en la ración indujeron modificaciones en la estructura de la microbiota ruminal y solamente un 34% de los OTUs detectados fueron comunes en todas las condiciones experimentales analizadas.
4. La reducción del nivel de PB de la ración del 12 al 10% MF incrementó los niveles de biodiversidad de la microbiota ruminal (en términos de riqueza de OTUs) y la abundancia relativa de ciertas poblaciones bacterianas proteolíticas (i.e. *Prevotellaceae* y *Olsenella*), lo que puede responder a una estrategia de adaptación de la microbiota ruminal a unas condiciones de déficit proteico.
5. El incremento en la proporción de forraje ingerido (6%, 12% y 24% MF) al sustituir la paja de cebada por ensilado de veza aumentó los niveles de biodiversidad de la microbiota ruminal (en términos de riqueza de OTUs) y la abundancia relativa de determinadas poblaciones bacterianas fibrolíticas (i.e. *Fibrobacteres* y *Spirochaetes*) y arqueas, además de posibilitar el establecimiento de una población de protozoos en el rumen.
6. La reducción del contenido de PB de la ración alteró el perfil metabolómico de los animales establecido a partir del análisis de muestras de orina y plasma. Dicha alteración se caracterizó por la aparición de metabolitos diferenciales entre los animales adscritos a distintos niveles de ingestión proteica, teniendo el efecto una mayor definición en orina que en plasma.

VII. REFERENCIAS

- Abbeddou, S., Rihawi, S., Hess, H.D., Iñiguez, L., Mayer, A.C., Kreuzer, M., 2011. Nutritional composition of lentil straw, vetch hay, olive leaves, and saltbush leaves and their digestibility as measured in fat-tailed sheep. *Small Ruminant Research* 96, 126–135. doi:10.1016/j.smallrumres.2010.11.017.
- AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación), 2015. Cereales, productos a base de cereales y alimentos para animales. Determinación del contenido de grasa bruta y grasa total mediante el método de extracción de Randall (ISO 11085:2015).
- AFRC (Agricultural and Food Research Council), 1993. Energy and protein requirements of ruminant. An advisory manual prepared by the ARC technical Committee on response to nutrients. Wallingford, Reino Unido: CAB International.
- Allison, M.J., Bryant, M.P., 1963. Biosynthesis of branched-chain amino acids from branched-chain fatty acids by rumen bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 101, 269–277. doi:10.1016/S0003-9861(63)80012-0.
- Alves, F.J.L., Ferreira, M. de A., Urbano, S.A., Andrade, R. de P.X. de, Silva, Á.E.M. da, Siqueira, M.C.B. de, Oliveira, J.P.F. de, Silva, J. de L., Alves, F.J.L., Ferreira, M. de A., Urbano, S.A., Andrade, R. de P.X. de, Silva, Á.E.M. da, Siqueira, M.C.B. de, Oliveira, J.P.F. de, Silva, J. de L., 2016. Performance of lambs fed alternative protein sources to soybean meal. *Revista Brasileira de Zootecnia* 45, 145–150. doi:10.1590/S1806-92902016000400001.
- Amat, S., McKinnon, J.J., Penner, G.B., Hendrick, S., 2014. Effects of dietary sulfur concentration and forage-to-concentrate ratio on ruminal fermentation, sulfur metabolism, and short-chain fatty acid absorption in beef heifers. *Journal of Animal Science* 92, 712–723. doi:10.2527/jas.2013-7254.
- Ametaj, B.N., Zebeli, Q., Saleem, F., Psychogios, N., Lewis, M.J., Dunn, S.M., Xia, J., Wishart, D.S., 2010. Metabolomics reveals unhealthy alterations in rumen metabolism with increased proportion of cereal grain in the diet of dairy cows. *Metabolomics* 6, 583–594. doi:10.1007/s11306-010-0227-6.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemistry), 2000. Official Methods of Analysis of AOAC international, (17a edición). Gaithersburg, EUA: AOAC International.
- ARC (Agricultural Research Council), 1984. The nutrient requirements of ruminant livestock. Supplement nº1. Commonwealth Agricultural Bureau, Reino Unido.

- Archibeque, S.L., Burns, J.C., Huntington, G.B., 2002. Nitrogen metabolism of beef steers fed endophyte-free tall fescue hay: effects of ruminally protected methionine supplementation. *Journal of Animal Science* 80, 1344–1351.
- Archibeque, S.L., Burns, J.C., Huntington, G.B., 2001. Urea flux in beef steers: effects of forage species and nitrogen fertilization. *Journal of Animal Science* 79, 1937–1943.
- Archibeque, S.L., Freetly, H.C., Cole, N.A., Ferrell, C.L., 2007a. The influence of oscillating dietary protein concentrations on finishing cattle. II. Nutrient retention and ammonia emissions. *Journal of Animal Science* 85, 1496–1503. doi:10.2527/jas.2006-208.
- Archibeque, S.L., Miller, D.N., Freetly, H.C., Berry, E.D., Ferrell, C.L., 2007b. The influence of oscillating dietary protein concentrations on finishing cattle. I. Feedlot performance and odorous compound production. *Journal of Animal Science* 85, 1487–1495. doi:10.2527/jas.2006-205.
- Arroyo, J.M., González, J., Ouarti, M., Silván, J.M., Castillo, M.L.R. del, Moreno, F. de la P., 2013. Malic acid or orthophosphoric acid-heat treatments for protecting sunflower (*Helianthus annuus*) meal proteins against ruminal degradation and increasing intestinal amino acid supply. *Animal* 7, 223–231. doi:10.1017/S1751731112001292.
- Bach, A., Calsamiglia, S., Stern, M.D., 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* 88 Suppl 1, E9-21. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)73133-7.
- Balcells, J., 1990. La excreción urinaria de derivados de las purinas en el ganado ovino como índice del aporte de proteína microbiana al duodeno. Tesis doctoral, Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.
- Balcells, J., Aris, A., Serrano, A., Seradj, A.R., Crespo, J., Devant, M., 2012. Effects of an extract of plant flavonoids (Bioflavex) on rumen fermentation and performance in heifers fed high-concentrate diets. *Journal of Animal Science* 90, 4975–4984. doi:10.2527/jas.2011-4955.
- Balcells, J., Guada, J.A., Castrillo, C., Gasa, J., 1991. Urinary excretion of allantoin and allantoin precursors by sheep after different rates of purine infusion into the duodenum. *Journal of Agricultural Science* 116, 309–317. doi:10.1017/S002185960007773X.
- Beauchemin, K.A., Buchanan-Smith, J.G., 1990. Effects of fiber source and method of feeding on chewing activities, digestive function, and productivity of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 73, 749–762. doi:10.3168/jds.S0022-0302(90)78728-0.
- Beckonert, O., Keun, H.C., Ebbels, T.M.D., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., 2007. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols* 2, 2692–2703. doi:10.1038/nprot.2007.376.

- Belanche, A., 2008. Estudio del ecosistema ruminal y la producción de proteína microbiana mediante PCR a tiempo real. Tesis doctoral, Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.
- Belanche, A., de la Fuente, G., Newbold, C.J., 2014. Study of methanogen communities associated with different rumen protozoal populations. *FEMS Microbiology Ecology* 90, 663–677. doi:10.1111/1574-6941.12423.
- Belanche, A., de la Fuente, G., Yáñez-Ruiz, D.R., Newbold, C.J., Calleja, L., Balcells, J., 2011. Technical note: The persistence of microbial-specific DNA sequences through gastric digestion in lambs and their potential use as microbial markers. *Journal of Animal Science* 89, 2812–2816. doi:10.2527/jas.2010-3193.
- Belanche, A., Doreau, M., Edwards, J.E., Moorby, J.M., Pinloche, E., Newbold, C.J., 2012. Shifts in the rumen microbiota due to the type of carbohydrate and level of protein ingested by dairy cattle are associated with changes in rumen fermentation. *Journal of Nutrition* 142, 1684–1692. doi:10.3945/jn.112.159574.
- Benchaar, C., McAllister, T.A., Petit, H.V., Chouinard, P.Y., 2014. Whole flax seed and flax oil supplementation of dairy cows fed high-forage or high-concentrate diets: Effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, protozoal populations and milk fatty acid profile. *Animal Feed Science and Technology* 198, 117–129. doi:10.1016/j.anifeedsci.2014.10.003.
- Bergman, E.N., 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews* 70, 567–590.
- Bergmann, G.T., 2017. Microbial community composition along the digestive tract in forage- and grain-fed bison. *BMC Veterinary Research* 13, 253. doi:10.1186/s12917-017-1161-x.
- Bertram, H.C., Bach Knudsen, K.E., Serena, A., Malmendal, A., Nielsen, N.C., Fretté, X.C., Andersen, H.J., 2006. NMR-based metabonomic studies reveal changes in the biochemical profile of plasma and urine from pigs fed high-fibre rye bread. *British Journal of Nutrition* 95, 955–962.
- Bertram, H.C., Kristensen, N.B., Malmendal, A., Nielsen, N.C., Bro, R., Andersen, H.J., Harmon, D.L., 2005. A metabolomic investigation of splanchnic metabolism using ¹H NMR spectroscopy of bovine blood plasma. *Analytica Chimica Acta* 536, 1–6. doi:10.1016/j.aca.2004.12.070.
- BOE, 1995. Determinación de las cenizas insolubles en ácido clorhídrico en Real Decreto 2257/1994, de 25 de noviembre, por el que se aprueba los métodos oficiales de análisis de piensos o alimentos para animales y sus primeras materias. BOE nº52, de 2 de marzo, 7161-7237.

- Bondi, A. A., 1989. *Nutrición Animal*. Zaragoza, España: Acribia, S.A.
- Boudra, H., Doreau, M., Noziere, P., Pujos-Guillot, E., Morgavi, D.P., 2012. Simultaneous analysis of the main markers of nitrogen status in dairy cow's urine using hydrophilic interaction chromatography and tandem mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* 1256, 169–176. doi:10.1016/j.chroma.2012.07.094.
- Calderon-Cortes, J.F., Zinn, R.A., 1996. Influence of dietary forage level and forage coarseness of grind on growth performance and digestive function in feedlot steers *Journal of Animal Science* 74, 2310–2316.
- Canbolat, O., Kamalak, A., Efe, E., Sahin, M., Ozkan, C.O., 2005. Effect of heat treatment on in situ rumen degradability and in vitro gas production of full-fat soyabeans and soyabean meal. *South African Journal of Animal Sciences* 35, 186–194.
- Caplis, J., Keane, M.G., Moloney, A.P., O'Mara, F.P., 2005. Effects of supplementary concentrate level with grass silage, and separate or total mixed ration feeding, on performance and carcass traits of finishing steers. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 44, 27–43. doi:10.2307/25562530.
- Carrasco, R., Arrizon, A.A., Plascencia, A., Torrentera, N.G., Zinn, R.A., 2013. Comparative feeding value of distillers dried grains plus solubles as a partial replacement for steam-flaked corn in diets for calf-fed Holstein steers: characteristics of digestion, growth performance, and dietary energetics. *Journal of Animal Science* 91, 1801–1810. doi:10.2527/jas.2012-5260.
- Carro, M.D., 2001. La determinación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen: comparación entre marcadores microbianos (Revisión). *Investigación agraria. Producción y sanidad animal*, 16 (1), 5-27.
- Carro, M.D., Valdés, C., Ranilla, M.J., González, J.S., 2000. Effect of forage to concentrate ratio in the diet on ruminal fermentation and digesta flow kinetics in sheep offered food at a fixed and restricted level of intake. *Animal Science* 70, 127–134. doi:10.1017/S1357729800051663.
- Castillo-González, A.R., Burrola-Barraza, M.E., Domínguez-Viveros, J., Chávez-Martínez, A., 2014. Microorganismos y fermentación ruminal. *Archivos de medicina veterinaria* 46, 349–361. doi:10.4067/S0301-732X2014000300003.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., Alland, D., 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 69, 330–339. doi:10.1016/j.mimet.2007.02.005.
- Chaney, A.L., Marbach, E.P., 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry* 8, 130–132.

- Cheeke, P. R., Dierenfeld, E. S., 2010. Comparative animal nutrition and metabolism. Cambridge, Reino Unido: CAB International.
- Chen, X.B., Grubic, G., Ørskov, E.R., Osuji, P., 1992. Effect of feeding frequency on diurnal variation in plasma and urinary purine derivatives in steers. *Animal Science* 55, 185–191. doi:10.1017/S0003356100037442.
- Chen, X.B., Hovell, F.D., Orskov, E.R., Brown, D.S., 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. *British Journal of Nutrition* 63, 131–142.
- Chen, H., 2016. VennDiagram: Generate High-Resolution Venn and Euler Plots. Versión paquete R 1.6.17.
- Cherdthong, A., Wanapat, M., Saenkamsorn, A., Supamong, C., Anantasook, N., Gunun, P., 2015. Improving rumen ecology and microbial population by dried rumen digesta in beef cattle. *Tropical Animal Health and Production* 47, 921–926. doi:10.1007/s11250-015-0809-4.
- Chizzotti, M.L., Valadares Filho, S. de C., Valadares, R.F.D., Chizzotti, F.H.M., Tedeschi, L.O., 2008. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. *Livestock Science* 113, 218–225. doi:10.1016/j.livsci.2007.03.013.
- Church, C.D., 1993. El ruminante, fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza, España: Acribia, S.A.
- Church, C.D., Pond, W.G., 1977. Bases científicas para la nutrición y alimentación de los animales domésticos. Zaragoza, España: Acribia, S.A.
- Coblentz, W.K., Grabber, J.H., 2013. In situ protein degradation of alfalfa and birdsfoot trefoil hays and silages as influenced by condensed tannin concentration. *Journal of Dairy Science* 96, 3120–3137. doi:10.3168/jds.2012-6098.
- Cole, N.A., Defoor, P.J., Galyean, M.L., Duff, G.C., Gleghorn, J.F., 2006. Effects of phase-feeding of crude protein on performance, carcass characteristics, serum urea nitrogen concentrations, and manure nitrogen of finishing beef steers. *Journal of Animal Science* 84, 3421–3432. doi:10.2527/jas.2006-150.
- Costa, S., Ventura, G., Balcells, J., Mora, J., Cortes-Lacruz, X., de la Fuente, G., Villalba, D., 2017. Uso del nitrógeno de urea en sangre para evaluar el nivel de proteína de las raciones de terneros de engorde. AIDA (Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario), XVII Jornadas sobre Producción Animal, 324-326.

- Costa-Silva, L.F. e, Filho, V., Campos, S. de, Chizzotti, M.L., Rotta, P.P., Prados, L.F., Valadares, R.F.D., Zanetti, D., Braga, J.M. da S., 2012. Creatinine excretion and relationship with body weight of Nellore cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia* 41, 807–810. doi:10.1590/S1516-35982012000300046.
- Cottle, D.J., Nolan, J.V., Wiedemann, S.G., 2011. Ruminant enteric methane mitigation: a review. *Animal Production Science* 51, 491–514. doi:10.1071/AN10163.
- Cunningham, J.G., 2003. *Fisiología veterinaria* (3a edición). Madrid, España: Elsevier España, S.A.
- Dapoza, C., Castrillo, C., Balcells, J., Martin-Orue, S., Guada, J.A., 1999. On the variation of urinary excretion of creatinine and purine derivatives in pregnant and lactating ewes given diets with different protein contents. *Animal Science* 68, 555-566.
- de la Fuente, G., Skirnisson, K., Dehority, B.A., 2006. Rumen ciliate fauna of Icelandic cattle, sheep, goats and reindeer. *Zootaxa* 1377, 47–60.
- de Menezes, A.B., Lewis, E., O'Donovan, M., O'Neill, B.F., Clipson, N., Doyle, E.M., 2011. Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS Microbiology Ecology* 78, 256–265. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01151.x.
- de Oliveira Franco, M., Detmann, E., de Campos Valadares Filho, S., Batista, E.D., de Almeida Rufino, L.M., Barbosa, M.M., Lopes, A.R., 2017. Intake, digestibility, and rumen and metabolic characteristics of cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogen and different levels of starch. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 30, 797–803. doi:10.5713/ajas.16.0629.
- Dehority, B.A., Johnson, R.R., Bentley, O.G., Moxon, A.L., 1958. Studies on the metabolism of valine, proline, leucine and isoleucine by rumen microorganisms in vitro. *Archives of Biochemistry* 78, 15–27.
- Demirel, M., Cengiz, F., Erdoğan, S., Çelik, S., 2003. A study on silage quality and rumen degradability of mixed silages containing different levels of sudangrass and hungarian vetch. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 27, 853–859.
- Deusch, S., Camarinha-Silva, A., Conrad, J., Beifuss, U., Rodehutschord, M., Seifert, J., 2017. A structural and functional elucidation of the rumen microbiome influenced by various diets and microenvironments. *Frontiers in Microbiology* 8, 1605. doi:10.3389/fmicb.2017.01605.
- Devant, M., Ferret, A., Calsamiglia, S., Casals, R., Gasa, J., 2001. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied in vivo and in vitro. *Journal of Animal Science* 79, 1944–1953. doi:10.2527/2001.7971944x.

- Devant, M., Ferret, A., Gasa, J., Calsamiglia, S., Casals, R., 2000. Effects of protein concentration and degradability on performance, ruminal fermentation, and nitrogen metabolism in rapidly growing heifers fed high-concentrate diets from 100 to 230 kg body weight. *Journal of Animal Science* 78, 1667–1676.
- Dias, R.S., Patino, H.O., López, S., Prates, E., Swanson, K.C., France, J., 2011. Relationships between chewing behavior, digestibility, and digesta passage kinetics in steers fed oat hay at restricted and ad libitum intakes. *Journal of Animal Science* 89, 1873–1880. doi:10.2527/jas.2010-3156.
- Dinning, J.S., Gallup, W.D., Briggs, H.M., 1949. Excretion of creatinine and creatine by beef steers. *Journal of Biological Chemistry* 177, 157–161.
- Dipu, M.T., George, S.K., Shingh, P., Verma, A.K., Mehra, U.R., 2006. Measurement of microbial protein supply in murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) using urinary purine derivatives excretion and PDC index. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 19, 347–355. doi:2006.19.3.347.
- Dumont, B., González-García, E., Thomas, M., Fortun-Lamothe, L., Ducrot, C., Dourmad, J.Y., Tichit, M., 2014. Forty research issues for the redesign of animal production systems in the 21st century. *Animal* 8, 1382–1393. doi:10.1017/S1751731114001281.
- Duncan, S.H., Hold, G.L., Barcenilla, A., Stewart, C.S., Flint, H.J., 2002. *Roseburia intestinalis* sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1615–1620. doi:10.1099/00207713-52-5-1615.
- Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Castañeda, J.S.M., Camacho, L.M., Kholif, A.E., Chagoyán, J.C.V., 2015. Direct-fed microbes: A tool for improving the utilization of low quality roughages in ruminants. *Journal of Integrative Agriculture* 14, 526–533. doi:10.1016/S2095-3119(14)60834-0.
- Ellison, M.J., Conant, G.C., Cockrum, R.R., Austin, K.J., Truong, H., Becchi, M., Lamberson, W.R., Cammack, K.M., 2014. Diet alters both the structure and taxonomy of the ovine gut microbial ecosystem. *DNA Research* 21, 115–125. doi:10.1093/dnares/dst044.
- EPA (United States Environmental Protection Agency), 2007. Method 6010C (SW-846): Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry, 3a revisión.
- Era7 Information Technologies, 2016. Era7 Bioinformatics, Granada, España. Recuperado de: <https://era7bioinformatics.com/>.
- Erickson, G.E., Klopfenstein, T.J., 2001. Managing N inputs and the effect on N losses following excretion in open-dirt feedlots in Nebraska. *Scientific World Journal* 1 Supplement 2, 830–835. doi:10.1100/tsw.2001.363.

- Erjaei, K., Zali, A., Ganjkanloo, M., Dehghan-Banadaky, M., Tufarelli, V., Laudadio, V., 2012. Effects of wheat processing and dietary fat sources on performance, ruminal and blood parameters, and steak fatty acids profile of Holstein steers. *Livestock Science* 149, 74–82. doi:10.1016/j.livsci.2012.06.031.
- Esdale, W.J., Broderick, G.A., Satter, L.D., 1968. Measurement of ruminal volatile fatty acid production from alfalfa hay or corn silage rations using a continuous infusion isotope dilution technique. *Journal of Dairy Science* 51, 1823–1830. doi:10.3168/jds.S0022-0302(68)87285-6.
- FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal), 2008. Normas FEDNA: Necesidades nutricionales para rumiantes en cebo. Madrid, España: Ediciones Peninsular, S.L.
- FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal), 2010. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos (3ª edición). Madrid, España.
- Fernández, A., García, C., Saéz, J.A., Valdezate, S., 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Madrid, España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Fernando, S.C., Purvis, H.T., Najar, F.Z., Sukharnikov, L.O., Krehbiel, C.R., Nagaraja, T.G., Roe, B.A., DeSilva, U., 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 7482–7490. doi:10.1128/AEM.00388-10.
- Fiehn, O., 2002. Metabolomics: the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48, 155–171.
- Frolkis, A.; Knox, C.; Lim, E.; Jewison, T.; Law, V.; Hau, D.H.; Liu, P.; Gautam, B.; Ly, S.; Guo, A.C.; Xia, J.; Liang, Y.; Shrivastava, S.; Wishart, D.S., 2010. SMPDB: The Small Molecule Pathway Database. *Nucleic Acids Research* 38, D480-D487.
- Galles, K., Ham, J., Westover, E., Stratton, J., Wagner, J., Engle, T., Bryant, T.C., 2011. Influence of reduced nitrogen diets on ammonia emissions from cattle feedlot pens. *Atmosphere* 2, 655–670. doi:10.3390/atmos2040655.
- Gorissen, L., Raes, K., Weckx, S., Dannenberger, D., Leroy, F., De Vuyst, L., De Smet, S., 2010. Production of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid isomers by *Bifidobacterium* species. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87, 2257–2266. doi:10.1007/s00253-010-2713-1.

- Górka, P., Castillo-Lopez, E., Joy, F., Chibisa, G.E., McKinnon, J.J., Penner, G.B., 2015. Effect of including high-lipid by-product pellets in substitution for barley grain and canola meal in finishing diets for beef cattle on ruminal fermentation and nutrient digestibility. *Journal of Animal Science* 93, 4891–4902. doi:10.2527/jas.2015-9282.
- Gowda, G.A.N., Zhang, S., Gu, H., Asiago, V., Shanaiah, N., Raftery, D., 2008. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 8, 617–633. doi:10.1586/14737159.8.5.617.
- Hales, K.E., Foote, A.P., Brown-Brandl, T.M., Freetly, H.C., 2017. The effects of feeding increasing concentrations of corn oil on energy metabolism and nutrient balance in finishing beef steers. *Journal of Animal Science* 95, 939–948. doi:10.2527/jas.2016.0902
- Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., Global Rumen Census Collaborators, Janssen, P.H., 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports* 5, 14567. doi:10.1038/srep14567.
- Henderson, G., Cox, F., Kittelmann, S., Miri, V.H., Zethof, M., Noel, S.J., Waghorn, G.C., Janssen, P.H., 2013. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. *PLoS ONE* 8(9), e74787. doi:10.1371/journal.pone.0074787.
- Henriksson, M., Cederberg, C., Swensson, C., 2014. Carbon footprint and land requirement for dairy herd rations: Impacts of feed production practices and regional climate variations. *Animal* 8, 1329–1338. doi:10.1017/S1751731114000627.
- Hernández, J., Benedito, J.L., Abuelo, A., Castillo, C., 2014. Ruminal acidosis in feedlot: From aetiology to prevention. *The Scientific World Journal*, 2014, ID: 702572. doi:10.1155/2014/702572.
- Hernandez, J.D., Scott, P.T., Shephard, R.W., Al Jassim, R. a. M., 2008. The characterization of lactic acid producing bacteria from the rumen of dairy cattle grazing on improved pasture supplemented with wheat and barley grain. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1754–1763. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03696.x.
- Hernandez-Urdaneta, A., Coppock, C.E., McDowell, R.E., Gianola, D., Smith, N.E., 1976. Changes in forage-concentrate ratio of complete feeds for dairy cows. *Journal of Dairy Science* 59, 695–707. doi:10.3168/jds.S0022-0302(76)84260-9.
- Hill, J., McSweeney, C., Wright, A.-D.G., Bishop-Hurley, G., Kalantar-zadeh, K., 2016. Measuring methane production from ruminants. *Trends in Biotechnology* 34, 26–35. doi:10.1016/j.tibtech.2015.10.004.

- Horgan, R.P., Kenny, L.C., 2011. "Omic" technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist* 13, 189–195. doi:10.1576/toag.13.3.189.27672.
- Hristov, A.N., Callaway, T.R., Lee, C., Dowd, S.E., 2012. Rumen bacterial, archaeal, and fungal diversity of dairy cows in response to ingestion of lauric or myristic acid. *Journal of Animal Science* 90, 4449–4457. doi:10.2527/jas.2011-4624.
- Hristov, A.N., Hanigan, M., Cole, A., Todd, R., McAllister, T.A., Ndegwa, P.M., Rotz, A., 2011. Review: Ammonia emissions from dairy farms and beef feedlots. *Canadian Journal of Animal Science* 91, 1–35. doi:10.4141/CJAS10034.
- Huang, Y.F., Gao, X.L., Nan, Z.B., Zhang, Z.X., 2017. Potential value of the common vetch (*Vicia sativa* L.) as an animal feedstuff: A review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 101, 807–823. doi:10.1111/jpn.12617.
- Hungate, R.E., 1966. *The rumen and its microbes*. New York, EUA: Academic Press Inc.
- Illumina Inc, 2017. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation, Japón. Recuperado de: <https://support.illumina.com/>.
- INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), 1978. *Alimentation des Ruminants*. Paris, Francia: INRA.
- Jacob, C.C., Dervilly-Pinel, G., Biancotto, G., Le, B., 2014. Evaluation of specific gravity as normalization strategy for cattle urinary metabolome analysis. *Metabolomics* 10, 627–637. doi:10.1007/s11306-013-0604-z.
- JMP®, Versión Pro 12.0.1. 2015. SAS Institute Inc, EUA.
- Jouany, J.P., 1982. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents (microbial fermentation, biological liquids, analytic method using gas-liquid chromatography). *Sciences des Aliments* 2, 131–144.
- Kazemi-Bonchenari, M., Salem, A.Z.M., López, S., 2017. Influence of barley grain particle size and treatment with citric acid on digestibility, ruminal fermentation and microbial protein synthesis in Holstein calves. *Animal* 11(8), 1295-1302. doi:10.1017/S1751731116002810.
- Kertz, A.F., Prewitt, L.R., Lane, A.G., Campbell, J.R., 1970. Effect of dietary protein intake on creatinine excretion and the creatinine-nitrogen ratio in bovine urine. *Journal of Animal Science* 30, 278–282.

- Kocherginskaya, S.A., Aminov, R.I., White, B.A., 2001. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe* 7, 119–134. doi:10.1006/anae.2001.0378.
- Koh, H.-W., Kim, M.S., Lee, J.-S., Kim, H., Park, S.-J., 2015. Changes in the swine gut microbiota in response to porcine epidemic diarrhea infection. *Microbes and Environments* 30, 284–287. doi:10.1264/jsme2.ME15046.
- König, H.E., Liebich, H.G., 2011. *Anatomía de los Animales Domésticos – Tomo 2 (2a edición)*. Editorial Médica Panamericana.
- Kopecný, J., Zorec, M., Mrázek, J., Kobayashi, Y., Marinsek-Logar, R., 2003. *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 201–209. doi:10.1099/ijs.0.02345-0.
- Kraatz, M., Wallace, R.J., Svensson, L., 2011. *Olsenella umbonata* sp. nov., a microaerotolerant anaerobic lactic acid bacterium from the sheep rumen and pig jejunum, and emended descriptions of *Olsenella*, *Olsenella uli* and *Olsenella profusa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61, 795–803. doi:10.1099/ijs.0.022954-0.
- Krause, D.O., Denman, S.E., Mackie, R.I., Morrison, M., Rae, A.L., Attwood, G.T., McSweeney, C.S., 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 663–693.
- Krimpen, M.M. van, Bikker, P., Meer, I.M. van der, Peet-Schwering, C.M.C. van der, Vereijken, J.M., 2013. Cultivation, processing and nutritional aspects for pigs and poultry of European protein sources as alternatives for imported soybean products (No. 662). Wageningen UR Livestock Research, Lelystad, Países Bajos.
- Laparra, J., Kaabia, Z., Mooney, M., Buckley, T., Sherry, M., Le Bizec, B., Dervilly-Pinel, G., 2017. Impact of storage conditions on the urinary metabolomics fingerprint. *Analytica Chimica Acta* 951, 99–107. doi:10.1016/j.aca.2016.11.055.
- Lascano, G.J., Heinrichs, A.J., 2011. Effects of feeding different levels of dietary fiber through the addition of corn stover on nutrient utilization of dairy heifers precision-fed high and low concentrate diets. *Journal of Dairy Science* 94, 3025–3036. doi:10.3168/jds.2010-3831.
- Lau, K.T., Edwards, S., Diamond, D., 2004. Solid-state ammonia sensor based on Berthelot's reaction. *Sensors and Actuators B: Chemical* 98, 12–17. doi:10.1016/j.snb.2003.08.004.

- Leahy, S.C., Kelly, W.J., Li, D., Li, Y., Altermann, E., Lambie, S.C., Cox, F., Attwood, G.T., 2013. The complete genome sequence of *Methanobrevibacter* sp. *AbM4*. *Standards in Genomic Sciences* 8, 215–227. doi:10.4056/sigs.3977691.
- Leschine, S.B., 1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annual Review of Microbiology* 49, 399–426. doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.002151.
- Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P., Ramey, R.R., Bircher, J.S., Schlegel, M.L., Tucker, T.A., Schrenzel, M.D., Knight, R., Gordon, J.I., 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 320, 1647–1651. doi:10.1126/science.1155725.
- Li, Y., Xu, C., Xia, C., Zhang, H., Sun, L., Gao, Y., 2014. Plasma metabolic profiling of dairy cows affected with clinical ketosis using LC/MS technology. *Veterinary Quarterly* 34, 152–158. doi:10.1080/01652176.2014.962116.
- Lin, K.W., Patterson, J.A., Ladisch, M.R., 1985. Anaerobic fermentation: Microbes from ruminants. *Enzyme and Microbial Technology* 7, 98–107. doi:10.1016/0141-0229(85)90137-1.
- López, A., Arroquy, J.I., Sequeira, A.V.J., DiLorenzo, N., Barrionuevo, M.C., Distel, R.A., 2017. High-sulfate water consumption determines intake and metabolic responses to protein supplementation in lambs consuming low-quality forage. *Journal of Animal Science* 95, 2111–2120. doi:http://dx.doi.org/10.2527/jas2016.1264.
- Magoč, T., Salzberg, S.L., 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27, 2957–2963. doi:10.1093/bioinformatics/btr507.
- Maher, A.D., Hayes, B., Cocks, B., Marett, L., Wales, W.J., Rochfort, S.J., 2013. Latent biochemical relationships in the blood-milk metabolic axis of dairy cows revealed by statistical integration of ¹H NMR spectroscopic data. *Journal of Proteome Research* 12, 1428–1435. doi:10.1021/pr301056q.
- Mao, S.Y., Zhang, R.Y., Wang, D.S., Zhu, W.Y., 2013. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing. *Anaerobe* 24, 12–19. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.08.003.
- MAPAMA (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente), Subdirección General de Productos Ganaderos, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, 2016. Caracterización del sector vacuno de carne en España.
- Marcon, E., Herault, B., 2015. entropart: An R package to measure and partition diversity. *Journal of Statistical Software*, 67(8), 1-26. doi: 10.18637/jss.v067.i08.

- Martín-Orúe, S.M., Balcells, J., Guada, J.A., Fondevila, M., 2000. Microbial nitrogen production in growing heifers: direct measurement of duodenal flow of purine bases versus urinary excretion of purine derivatives as estimation procedures. *Animal Feed Science and Technology* 88, 171–188. doi:10.1016/S0377-8401(00)00221-2.
- Martín-Orúe, S.M., Balcells, J., Zakraoui, F., Castrillo, C., 1998. Quantification and chemical composition of mixed bacteria harvested from solid fractions of rumen digesta: effect of detachment procedure. *Animal Feed Science and Technology* 71, 269–282. doi:10.1016/S0377-8401(97)00156-9.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., Sinclair, L.A., Wilkinson, R.G., 2010. *Animal Nutrition* (7a edición). San Francisco, EUA: Benjamin-Cummings Publishing Company.
- McIntyre, K.H., 1970. The effects of increased nitrogen intakes on plasma urea nitrogen and rumen ammonia levels in sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* 21, 501–507. doi:10.1071/ar9700501.
- Megías, C., Cortés-Giraldo, I., Girón-Calle, J., Vioque, J., Alaiz, M., 2014. Determination of β -Cyano-L-alanine, γ -Glutamyl- β -cyano-L-alanine, and common free amino acids in *Vicia sativa* (*Fabaceae*) seeds by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2014, 409089. doi:10.1155/2014/409089.
- Mickdam, E., Khiaosa-Ard, R., Metzler-Zebeli, B.U., Klevenhusen, F., Chizzola, R., Zebeli, Q., 2016. Rumen microbial abundance and fermentation profile during severe subacute ruminal acidosis and its modulation by plant derived alkaloids in vitro. *Anaerobe* 39, 4–13. doi:10.1016/j.anaerobe.2016.02.002.
- Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R., Campíns-Falcó, P., 2005. Improved detection limit for ammonium/ammonia achieved by Berthelot's reaction by use of solid-phase extraction coupled to diffuse reflectance spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* 534, 327–334. doi:10.1016/j.aca.2004.11.044.
- Molle, G., Decandia, M., Sölter, U., Greef, J.M., Rochon, J.J., Sitzia, M., Hopkins, A., Rook, A.J., 2008. The effect of different legume-based swards on intake and performance of grazing ruminants under Mediterranean and cool temperate conditions. *Grass and Forage Science* 63, 513–530. doi:10.1111/j.1365-2494.2008.00659.x.
- Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C., Newbold, C.J., 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4, 1024–1036. doi:10.1017/S1751731110000546.

- Moumen, A., Azizi, G., Chekroun, K.B., Baghour, M., 2016. The effects of livestock methane emission on the global warming: a review. *International Journal of Global Warming* 9, 229–253. doi:10.1504/IJGW.2016.074956.
- Muller, L.D., 1987. Branched chain fatty acids (isoacids) and valeric acid for ruminants. *Professional Animal Scientist* 3, 9–12. doi:10.15232/S1080-7446(15)32370-6.
- Murphy, M., Akerlind, M., Holtenius, K., 2000. Rumen fermentation in lactating cows selected for milk fat content fed two forage to concentrate ratios with hay or silage. *Journal of Dairy Science* 83, 756–764. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74938-1.
- Neubauer, V., Humer, E., Kröger, I., Braid, T., Wagner, M., Zebeli, Q., 2017. Differences between pH of indwelling sensors and the pH of fluid and solid phase in the rumen of dairy cows fed varying concentrate levels. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 23. doi:10.1111/jpn.12675.
- Nicholson, J.K., Lindon, J.C., Holmes, E., 1999. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29, 1181–1189. doi:10.1080/004982599238047.
- Nørskov, N.P., Hedemann, M.S., Lærke, H.N., Knudsen, K.E.B., 2013. Multicompartmental nontargeted LC-MS metabolomics: explorative study on the metabolic responses of rye fiber versus refined wheat fiber intake in plasma and urine of hypercholesterolemic pigs. *Journal of Proteome Research* 12, 2818–2832. doi:10.1021/pr400164b.
- Oksanen, J.; Blanchet, F.G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlinn, D.; Minchin, P.R.; O’Hara, R.B.; Simpson, G.L.; Solymos, P.; Stevens, M.H.H.; Szoecs, E.; Wagner, H., 2017. *vegan: Community Ecology Package*. Versión paquete R 2.4-3.
- Orellana Boero, P., Balcells, J., Martín-Orúe, S.M., Liang, J.B., Guada, J.A., 2001. Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. *Livestock Production Science* 68, 243–250. doi:10.1016/S0301-6226(00)00231-1.
- Ørskov, E.R., McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science* 92, 499–503. doi:10.1017/S0021859600063048.
- Owens, F.N., Gill, D.R., Secrist, D.S., Coleman, S.W., 1995. Review of some aspects of growth and development of feedlot cattle. *Journal of Agricultural Science* 73, 3152–3172.
- Paradis, E., Claude, J., Strimmer, K., 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20, 289-290.

- Parikh, H.I., Koparde, V.N., Bradley, S.P., Buck, G.A., Sheth, N.U., 2016. MeFiT: merging and filtering tool for illumina paired-end reads for 16S rRNA amplicon sequencing. *BMC Bioinformatics* 17, 491. doi:10.1186/s12859-016-1358-1.
- Park, H.G., Heo, W., Kim, S.B., Kim, H.S., Bae, G.S., Chung, S.H., Seo, H.-C., Kim, Y.J., 2011. Production of conjugated linoleic acid (CLA) by *Bifidobacterium breve* LMC520 and its compatibility with CLA-producing rumen bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 984–988. doi:10.1021/jf103420q.
- Patel, R.K., Jain, M., 2012. NGS QC Toolkit: A Toolkit for Quality Control of Next Generation Sequencing Data. *PLoS ONE* 7(2), e30619. doi:10.1371/journal.pone.0030619.
- Petri, R.M., Schwaiger, T., Penner, G.B., Beauchemin, K.A., Forster, R.J., McKinnon, J.J., McAllister, T.A., 2013. Changes in the rumen epimural bacterial diversity of beef cattle as affected by diet and induced ruminal acidosis. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 3744–3755. doi:10.1128/AEM.03983-12.
- Peyraud, J.-L., Taboada, M., Delaby, L., 2014. Integrated crop and livestock systems in Western Europe and South America: A review. *European Journal of Agronomy*, Integrated crop-livestock 57, 31–42. doi:10.1016/j.eja.2014.02.005.
- Phelan, P., Moloney, A.P., McGeough, E.J., Humphreys, J., Bertilsson, J., O’Riordan, E.G., O’Kiely, P., 2015. Forage legumes for grazing and conserving in ruminant production systems. *Critical reviews in plant sciences* 34, 281-326.
- R Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria.
- Ramirez, R., Harvatine, K.J., Kononoff, P.J., 2016. Short communication: Forage particle size and fat intake affect rumen passage, the fatty acid profile of milk, and milk fat production in dairy cows consuming dried distillers grains with solubles. *Journal of Dairy Science* 99, 392–398. doi:10.3168/jds.2015-10006.
- Richterich, P., 1998. Estimation of errors in “raw” DNA sequences: a validation study. *Genome Research* 8, 251–259.
- Ringø, E., Sperstad, S., Kraugerud, O.F., Krogdahl, Å., 2008. Use of 16S rRNA gene sequencing analysis to characterize culturable intestinal bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with cellulose or non-starch polysaccharides from soy. *Aquaculture Research* 39, 1087–1100. doi:10.1111/j.1365-2109.2008.01972.x.
- Rodrigues, P.H.M., Mattos, W.R.S., Meyer, P.M., Lucci, C.S., Melotti, L., 2004. Effects of monensin level and roughage/concentrate ratio on ruminal fermentation in bovines. *Journal of Animal and Feed Sciences* 13, 195–198. doi:10.22358/jafs/73775/2004.

- Roessner, U., Bowne, J., 2009. What is metabolomics all about? *BioTechniques* 46, 363–365. doi:10.2144/000113133.
- Rooke, J.A., Wallace, R.J., Duthie, C.-A., McKain, N., de Souza, S.M., Hyslop, J.J., Ross, D.W., Waterhouse, T., Roehe, R., 2014. Hydrogen and methane emissions from beef cattle and their rumen microbial community vary with diet, time after feeding and genotype. *British Journal of Nutrition* 112, 398–407. doi:10.1017/S0007114514000932.
- Russell, J.B., Hespell, R.B., 1981. Microbial rumen fermentation. *Journal of Dairy Science* 64, 1153–1169. doi:10.3168/jds.S0022-0302(81)82694-X.
- Salcedo-Díaz, G., 1998. Valor nutritivo y degradabilidad ruminal de *Avena sativa* y *Vicia sativa*. *Pastos* 28, 71–85.
- Sales, J., Janssens, G., 2003. Acid-insoluble ash as a marker in digestibility studies: a review. *Journal of Animal and Feed Sciences* 12, 383–401.
- Salinas-Chavira, J., Alvarez, E., Montaño, M.F., Zinn, R.A., 2013. Influence of forage NDF level, source and pelletizing on growth performance, dietary energetics, and characteristics of digestive function for feedlot cattle. *Animal Feed Science and Technology* 183, 106–115. doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.05.004.
- Santana, A., Cajarville, C., Mendoza, A., Repetto, J.L., 2017. Combination of legume-based herbage and total mixed ration (TMR) maintains intake and nutrient utilization of TMR and improves nitrogen utilization of herbage in heifers. *Animal* 11, 616–624. doi:10.1017/S1751731116001956.
- Sasu-Boakye, Y., Cederberg, C., Wirsenius, S., 2014. Localizing livestock protein feed production and the impact on land use and greenhouse gas emissions. *Animal* 8, 1339–1348. doi:10.1017/S1751731114001293.
- Sath, K., Sokun, K., Pauly, T., Holtenius, K., 2012. Feed intake, digestibility, and N retention in cattle fed rice straw and para grass combined with different levels of protein derived from cassava foliage. *Asian-australasian Journal of Animal Sciences* 25, 956–961. doi:10.5713/ajas.2011.11482.
- Satter, L.D., Slyter, L.L., 1974. Effect of ammonia concentration of rumen microbial protein production in vitro. *British Journal of Nutrition* 32, 199–208.
- Seradj, A.R., Abecia, L., Crespo, J., Villalba, D., Fondevila, M., Balcells, J., 2014. The effect of Bioflavex® and its pure flavonoid components on in vitro fermentation parameters and methane production in rumen fluid from steers given high concentrate diets. *Animal Feed Science and Technology* 197, 85–91. doi:10.1016/j.anifeedsci.2014.08.013.

- Sinclair, K.D., Garnsworthy, P.C., Mann, G.E., Sinclair, L.A., 2014. Reducing dietary protein in dairy cow diets: implications for nitrogen utilization, milk production, welfare and fertility. *Animal* 8, 262–274. doi:10.1017/S1751731113002139.
- Singh, M., Sharma, K., Dutta, N., Singh, P., Verma, A.K., Mehra, U.R., 2007. Estimation of Rumen Microbial Protein Supply Using Urinary Purine Derivatives Excretion in Crossbred Calves Fed at Different Levels of Feed Intake. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 20, 1567–1574. doi:2007.20.10.1567.
- Soltan, Y.A., Morsy, A.S., Sallam, S.M.A., Louvandini, H., Abdalla, A.L., 2012. Comparative in vitro evaluation of forage legumes (*prosopis*, *acacia*, *atriplex*, and *leucaena*) on ruminal fermentation and methanogenesis. *Journal of Animal and Feed Sciences* 21, 759–772.
- Spanghero, M., Robinson, P.H., Zanfi, C., Fabbro, E., 2009. Effect of increasing doses of a microencapsulated blend of essential oils on performance of lactating primiparous dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 153, 153–157. doi:10.1016/j.anifeedsci.2009.06.004.
- Spek, J.W., Bannink, A., Gort, G., Hendriks, W.H., Dijkstra, J., 2013. Interaction between dietary content of protein and sodium chloride on milk urea concentration, urinary urea excretion, renal recycling of urea, and urea transfer to the gastrointestinal tract in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 96, 5734–5745. doi:10.3168/jds.2013-6842.
- Stanton, T.B., Canale-Parola, E., 1980. *Treponema bryantii* sp. nov., a rumen spirochete that interacts with cellulolytic bacteria. *Archives of Microbiology* 127, 145–156.
- Starke, S., Muscher, A.S., Hirschhausen, N., Pfeffer, E., Breves, G., Huber, K., 2012. Expression of urea transporters is affected by dietary nitrogen restriction in goat kidney. *Journal of Animal Science* 90, 3889–3897. doi:10.2527/jas.2011-4262.
- Steen-Olsen, K., Weinzettel, J., Cranston, G., Ercin, A.E., Hertwich, E.G., 2012. Carbon, land, and water footprint accounts for the european union: Consumption, production, and displacements through international trade. *Environmental Science and Technology* 46, 10883–10891. doi:10.1021/es301949t.
- Stella, R., Dervilly-Pinel, G., Bovo, D., Mastroianni, E., Royer, A.-L., Angeletti, R., Le Bizec, B., Biancotto, G., 2017. Metabolomics analysis of liver reveals profile disruption in bovines upon steroid treatment. *Metabolomics* 13, 80. doi:10.1007/s11306-017-1220-0.
- Sun, Y.-Z., Yang, H.-L., Ma, R.-L., Zhang, C.-X., Lin, W.-Y., 2011. Effect of dietary administration of *Psychrobacter* sp. on the growth, feed utilization, digestive enzymes and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture Nutrition* 17, e733–e740. doi:10.1111/j.1365-2095.2010.00837.x.

- Swanson, K.C., Carlson, Z.E., Ruch, M.C., Gilbery, T.C., Underdahl, S.R., Keomanivong, F.E., Bauer, M.L., Islas, A., 2017. Influence of forage source and forage inclusion level on growth performance, feeding behavior, and carcass characteristics in finishing steers. *Journal of Animal Science* 95, 1325–1334. doi:<http://dx.doi.org/10.2527/jas2016.1157>.
- Tagari, H., Pena, F., Satter, L.D., 1986. Protein degradation by rumen microbes of heat-treated whole cottonseed. *Journal of Animal Science* 62, 1732–1736.
- Takenaka, A., Tajima, K., Mitsumori, M., Kajikawa, H., 2004. Fiber digestion by rumen ciliate protozoa. *Microbes and Environments* 19, 203–210. doi:[10.1264/jsme2.19.203](https://doi.org/10.1264/jsme2.19.203).
- Tapio, I., Fischer, D., Blasco, L., Tapio, M., Wallace, R.J., Bayat, A.R., Ventto, L., Kahala, M., Negussie, E., Shingfield, K.J., Vilkki, J., 2017. Taxon abundance, diversity, co-occurrence and network analysis of the ruminal microbiota in response to dietary changes in dairy cows. *PLoS ONE* 12, e0180260. doi:[10.1371/journal.pone.0180260](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180260).
- Therion, J.J., Kistner, A., Kornelius, J.H., 1982. Effect of pH on growth rates of rumen amylolytic and lactilytic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 428–434.
- Thomson, E.F., Jaubert, R., Oglah, M., 1992. Using on-farm trials to study the benefits of feed legumes in barley-based rotations of north-west Syria. *Experimental Agriculture* 28, 143–154. doi:[10.1017/S001447970001958X](https://doi.org/10.1017/S001447970001958X).
- Tian, H., Wang, W., Zheng, N., Cheng, J., Li, S., Zhang, Y., Wang, J., 2015. Identification of diagnostic biomarkers and metabolic pathway shifts of heat-stressed lactating dairy cows. *Journal of Proteomics* 125, 17–28. doi:[10.1016/j.jprot.2015.04.014](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.04.014).
- Valderrama L., X., Anrique G., R., 2011. In situ rumen degradation kinetics of high-protein forage crops in temperate climates. *Chilean journal of agricultural research* 71, 572–577. doi:[10.4067/S0718-58392011000400012](https://doi.org/10.4067/S0718-58392011000400012).
- Valkeners, D., Théwis, A., Van Laere, M., Beckers, Y., 2008. Effect of rumen-degradable protein balance deficit on voluntary intake, microbial protein synthesis, and nitrogen metabolism in growing double-muscled Belgian Blue bulls fed corn silage-based diet. *Journal of Animal Science* 86, 680–690. doi:[10.2527/jas.2007-0258](https://doi.org/10.2527/jas.2007-0258).
- Van Soest, P.J., 1994. *Nutritional ecology of the ruminant* (2a edición). New York, EUA: Cornell University Press.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583–3597. doi:[10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).

- Vasconcelos, J.T., Cole, N.A., McBride, K.W., Gueye, A., Galyean, M.L., Richardson, C.R., Greene, L.W., 2009. Effects of dietary crude protein and supplemental urea levels on nitrogen and phosphorus utilization by feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 87, 1174–1183. doi:10.2527/jas.2008-1411.
- Vicini, J.L., Clark, J.H., Crooker, B.A., 1983. Effectiveness of acetic acid and formaldehyde for preventing protein degradation in the rumen. *Journal of Dairy Science* 66, 350–354. doi:10.3168/jds.S0022-0302(83)81796-2.
- Wallace, R.J., 1996. The proteolytic systems of ruminal microorganisms. *Research Journal of Animal Sciences* 45, 301–308. doi:10.1051/animres:19960653.
- Weimer, P.J., 1992. Cellulose degradation by ruminal microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology* 12, 189–223. doi:10.3109/07388559209069192.
- White, T.W., Grainger, R.B., Baker, F.H., Stroud, J.W., 1958. Effect of supplemental fat on digestion and the ruminal calcium requirement of sheep. *Journal of Animal Science* 17, 797–803. doi:10.2527/jas1958.173797x.
- Whitelaw, F.G., Hyldgaard-Jensen, J., Reid, R.S., Kay, M.G., 1970. Volatile fatty acid production in the rumen of cattle given an all-concentrate diet. *British Journal of Nutrition* 24, 179–195.
- Wilkins, R.J., Jones, R., 2000. Alternative home-grown protein sources for ruminants in the United Kingdom. *Animal Feed Science and Technology* 85, 23–32. doi:10.1016/S0377-8401(00)00140-1.
- Xia, J.; Wishart, D.S., 2010. MSEA: a web-based tool to identify biologically meaningful patterns in quantitative metabolomic data. *Nucleic Acids Research*, 38, W71-W77.
- Xia, J.; Wishart, D.S., 2016. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Current Protocols in Bioinformatics* 55, 14.10.1-14.10.91.
- Xu, C., Xia, C., Sun, Y., Xiao, X., Wang, G., Fan, Z., Shu, S., Zhang, H., Xu, Chuang, Yang, W., 2016. Metabolic profiles using ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy in postpartum dairy cows with ovarian inactivity. *Theriogenology* 86, 1475–1481. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.05.005.
- Yang, C.-M.J., 2002. Response of forage fiber degradation by ruminal microorganisms to branched-chain volatile fatty acids, amino acids, and dipeptides. *Journal of Dairy Science* 85, 1183–1190. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74181-7.

- Yang, Y., Zheng, N., Zhao, X., Zhang, Y., Han, R., Yang, J., Zhao, S., Li, S., Guo, T., Zang, C., Wang, J., 2016. Metabolomic biomarkers identify differences in milk produced by Holstein cows and other minor dairy animals. *Journal of Proteomics* 136, 174–182. doi:10.1016/j.jprot.2015.12.031.
- Zebeli, Q., Aschenbach, J.R., Tafaj, M., Boguhn, J., Ametaj, B.N., Drochner, W., 2012. Invited review: Role of physically effective fiber and estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 95, 1041–1056. doi:10.3168/jds.2011-4421.
- Zened, A., Combes, S., Cauquil, L., Mariette, J., Klopp, C., Bouchez, O., Troegeler-Meynadier, A., Enjalbert, F., 2013. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. *FEMS Microbiology Ecology* 83, 504–514. doi:10.1111/1574-6941.12011.
- Zinn, R.A., Shen, Y., 1996. Interaction of dietary calcium and supplemental fat on digestive function and growth performance in feedlot steers. *Journal of Animal Science* 74, 2303–2309.