



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin De Máster Universitario en Nutrición Animal

Título:

Evaluación del impacto de la presencia de animales adultos en corrales de lactancia artificial de crías de cabra sobre el crecimiento, colonización microbiana y capacidad digestiva tras el destete

Evaluation of the impact of the presence of adult animals in artificial milk feeding pens with goat kids on growth, microbial colonization and digestive capacity after weaning

Autora

Amira Arbaoui

Directores

David R. Yáñez-Ruiz y Alejandro Belanche García

Facultad de Veterinaria

Año: 2019

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directores David Yáñez y Alejandro Belanche, consejo e incansable ayuda a lo largo de toda la realización de este trabajo. Un trabajo que no habría sido posible elaborar sin las personas que han colaborado en la realización de los experimentos, y con las que he compartido laboratorio, trabajo en establo y muchos momentos. Por ello, agradezco enormemente a Juan-Manuel, Eli, Isa, Rafa y Noemí su trabajo y ayuda.

Gracias igualmente a mi familia y a todas las personas que me han apoyado y se han interesado sobre el trabajo que he estado realizando a lo largo de este curso.

Por último, mi agradecimiento a las instituciones que han financiado este trabajo: CSIC proyecto (**AGL2017-86938-R**)

LISTA DE TABLAS

Tablas	Página
Tabla 1 Principales protozoarios ruminales	13
Tabla 2 Los principales hongos ruminales	14
Tabla 3: desarrollo del rumen-retículo del bovino en función de la edad	28
Tabla 4: Volúmenes de AGV a añadir para elaborar el patrón	46
Tabla 5: Preparación de patrones para determinación de AGV	46
Tabla 6: Preparación de los estándares de análisis de amonio	46
Tabla 7: Patrón de fermentación del rumen de los cabritos de los grupos CTR (aislados de otros animales) y ADL (en compañía de animales adultos) a corto plazo (5, 7 Y 9 semanas respectivamente)	56
Tabla 8: Efecto a largo plazo (9 meses de edad) presencia de animales adultos y del tipo de dieta sobre la ingestión y fermentación ruminal in vivo y la producción de gas y producción de metano in vitro	61
Tabla 9: Concentraciones de microorganismos (bacterias, arqueas, protozoos) en líquido ruminal de los grupos alimentados con las dos dietas experimentales	67
Tabla 10: La ingesta de forraje, concentrado y la digestibilidad	67
Tabla 11: Efecto del tratamiento y sexo sobre el peso vivo de los animales (Kg)	70
Tabla 12: Las tasas de crecimiento de los animales	72
Tabla 13: Análisis de histología del epitelio del rumen	73
Tabla 14: Tracto gastrointestinal y peso de sus componentes	75

Lista de figuras	Página
Ilustración 1: Esquema del estómago de los rumiantes. Se diferencia el rumen (19), el retículo (5), omaso (6) y abomaso (10). Fuente: Dehority, 2002	6
Ilustración 2: Modelo de relación entre eficiencia animal y población microbiana (Ben Shabat et al., 2016)	9
Ilustración 3: la formación de ácidos grasos volátiles (Jean Pierre Jouany et Pierre Thivend. 2008)	19
Ilustración 4: Diagrama del metabolismo de los ácidos grasos volátiles del licor ruminal	21
Ilustración 5 Schematic microbial fermentation of feed polysaccharides and H ₂ reduction pathways in the rumen.	22
Ilustración 6: Diagrama de la sección transversa de la pared ruminal totalmente desarrollada	25
Ilustración 4: Patrón de establecimiento de diversos grupos bacterianos en el rumen en desarrollo de terneros	27
Ilustración 8: Concepto de programación microbiana del rumen.	32
Ilustración 9: Efecto de administración de levaduras en edades tempranas sobre la disminución del pH ruminal en cabras lecheras	33
Ilustración 10: Esquema del diseño experimental	40

Ilustración 11: Jaula metabólica	41
Ilustración 12: Una muestra de pool de orina	41
Ilustración 13: Muestras de heces individuales	42
Ilustración 14: Puesta de crisoles con muestras en horno de mufla y cenizas obtenidas al final	44
Ilustración 15: Bolsas F57 Filter Bags (Ankom Technology)	44
Ilustración 16: Momento de medida de presión de las botellas incubadas utilizando una aguja acoplada a un manómetro	49
Ilustración 17: Imágenes de rumen lleno, rumen vacío, peso omaso y abomaso respectivamente	50
Ilustración 18: Histología del rumen	50
Ilustración 19: Esquema del protocolo de extracción de ADN FavorPrep™ Stool Isolation Mini Kit (FAVORGEN Biotech Corp.)	51
Ilustración 20: pH del contenido ruminal	57
Ilustración 21: Producción de amonio en el rumen	58
Ilustración 22: porcentaje de ácido acético en cada grupo por S5, S7 y S9	58

Ilustración 23: Porcentaje del ácido butírico en el rumen	59
Ilustración 24: Evolución de la proporción molar del ácido butírico en el rumen durante el experimento	64
Ilustración 25: Evolución del peso en función del sexo y del tratamiento	71
Ilustración 26: Evolución del peso vivo de los animales desde el nacimiento hasta el sacrificio	72

Índice

1. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	4
I. LOS RUMIANTES Y SU IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA	4
II. EL ANIMAL RUMIANTE	6
1. Sistema digestivo.....	6
2. Papel de la saliva	8
I. EL ECOSISTEMA RUMINAL Y PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN	9
1. Microbiota del rumen, función y relación con la digestión.....	9
1.1 Síntesis de proteína microbiana.....	10
1.2 Los microorganismos del rumen	11
2. Fermentación y degradación de nutrientes en el rumen	14
3. Producción de ácidos grasos volátiles	18
4. Producción de CO ₂ y metano	21
1. pH del rumen	23
II. DESARROLLO DEL RUMEN	24
1. Tipo de lactancia, tipos de destete presencia/ausencia adultos	28
III. EFECTOS E IMPLICACIONES PRODUCTIVAS A LARGO PLAZO DE LOS FACTORES ANTERIORES.....	35
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIAL Y MÉTODOS	38
3.1 Diseño experimental.....	38
3.2 Digestibilidad	40
Determinación la ingesta.....	41
3.2.1 Componentes fibrosos	42
3.2.2 Determinación de la fibra	42
3.2.3 Determinación de la digestibilidad.....	44
3.3 Productos de fermentación ruminal.....	45
3.4 Sacrificio y histología del rumen.....	49
3.5 Cuantificación microbiana	51
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
4.1 Efectos a corto plazo: 5, 7 y 9 semanas de edad	55
4.2 Efectos a largo plazo (a partir de 9 meses de edad)	60
Efecto a largo plazo sobre ingestión, digestibilidad y crecimientos	68
Histología del rumen y tracto gastro-intestinal	73
5. CONCLUSIONES	77
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

Resumen

Para responder al incremento de la demanda de leche en el mundo, los sistemas de producción láctea se han intensificado notablemente. Una de las consecuencias de esta intensificación en estos sistemas es la separación de las crías tras el nacimiento de las madres, y su alimentación con lacto-reemplazante sin contacto con animales adultos, para así poder ordeñar a las madres y maximizar su producción. Esto restringe el traspaso de microorganismos digestivos de la madre a la cría y puede generar dificultades en el desarrollo microbiológico y fisiológico del rumen e inmunitario del animal durante la lactancia. En su conjunto esto podría comprometer el crecimiento y la vida productiva del animal frente a un sistema en el que las crías permanecen con las madres durante la lactancia. El presente estudio tiene como objetivo, comparar el efecto de la presencia o ausencia de animales adultos con los cabritos tras el nacimiento y durante la lactancia artificial sobre el crecimiento, el desarrollo ruminal y su colonización microbiana. También se planteó determinar la eficiencia digestiva de los cabritos a largo plazo utilizando 2 tipos de dietas diferentes; una dieta basada en alimento concentrado (CC) y otra que llevaba solo forraje (F). Para ese objetivo, se han utilizado 18 animales repartidos en dos grupos experimentales: grupo control (CTL) aislado de contacto con adultos desde el primer día hasta el fin del experimento y grupo tratamiento (ADL), el cual fue acompañado de 2 cabras adultas que no eran sus madres desde el nacimiento hasta los 4 meses de edad.

El estudio a corto plazo del efecto de la presencia o ausencia de adultos con los cabritos se llevó a cabo mediante la recogida y análisis de muestras de líquido ruminal a 3 edades diferentes: en el pre-destete en la semana 5 (S5), al destete en la semana 7 (S7) y al post-destete en la semana 9 (S9) de vida de los animales. Los resultados revelaron que no hay diferencias importantes en términos de fermentación ruminal. Sin embargo, el grupo ADL presentó una alta concentración de butirato ruminal al destete y una alta producción de amonio a 9 semanas de edad, lo que parece indicar la presencia de una comunidad activa de protozoos en el rumen.

Los resultados a largo plazo, en términos de productos de fermentación ruminal y cuantificación microbiana, revelaron una gran variabilidad de resultados entre los 2 grupos, sobre todo con el cambio de dieta. La concentración en arqueas fue más baja en el grupo CTL alimentándose con CC, aunque produjo más metano en relación a la

producción de AGV totales. En lo que concierne el grupo ADL, se observó, cierta persistencia de los efectos a nivel microbiológico cuando los animales recibieron dieta CC; ya que contenían más protozoos y bacterias y producían más butirato ruminal.

En relación a la digestibilidad, aparte de la esperada diferencia entre dietas experimentales (mayor en dieta concentrada), el efecto tratamiento en edades tempranas no ejerció ningún impacto reseñable.

El estudio histológico del epitelio ruminal, reveló que la presencia de compañeros adultos ayuda a un mejor desarrollo, sobre todo en el saco ventral. Sin embargo, estas diferencias no influyeron las tasas de crecimiento de los animales.

En general los resultados de este trabajo de Tesis muestran que la presencia de animales adultos acompañantes en corrales de lactancia artificial de cabritos ejercen algunos efectos sobre la colonización y desarrollo ruminal, pero que, en las condiciones empleadas en el estudio, no suponen una ventaja productiva en la vida adulta del animal.

1. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

En la producción lechera comercial, las crías son típicamente separadas de sus madres a una edad temprana para ser alimentadas con lacto-reemplazante. Esta separación física puede limitar el proceso natural de colonización microbiana y el desarrollo anatómico y funcional que ocurre cuando el recién nacido está en presencia de la madre que actúa como la principal fuente de inóculo microbiano (Abecia et al., 2014; 2017). En estos sistemas, la implementación de estrategias para maximizar el desarrollo ruminal en animales jóvenes es una prioridad para reducir el estrés post-destete y optimizar la función ruminal en el futuro animal adulto (Belanche et al., 2017). Así, aunque existen numerosos trabajos que han desarrollado productos que tienen un potencial prometedor como moduladores del ecosistema microbiano ruminal, (principalmente; los prebióticos, los probióticos y los compuestos activos de plantas, Gaggia et al., 2010), la información sobre su aplicación en rumiantes de corta edad es limitada (Yáñez-Ruiz et al., 2015).

Un estudio piloto reciente realizado en nuestro grupo empleó microbiota ruminal de animales adultos como probiótico para administrarla por inoculación directa a cabritos recién nacidos hasta el destete (Belanche et al., 2019). El resultado de esta experiencia fue positivo sobre el desarrollo microbiológico ruminal, reduciendo la pérdida de peso en el destete y sugiriendo que incluso podría realizarse un destete precoz con el consiguiente ahorro económico en lacto-reemplazante. No obstante, esta práctica no es aplicable en granja debido a la legislación sanitaria respecto a la transferencia de biofluidos entre animales, por lo que se planteó el presente trabajo para estudiar el efecto de la transmisión natural de microorganismos de animales adultos a animales jóvenes cuando comparten un mismo recinto.

I. LOS RUMIANTES Y SU IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA

Actualmente hay 7.500 millones de seres humanos en el planeta y el mapa mundial del hambre estima que 795 millones de personas (más del 10%) no tienen acceso a alimentos suficientes (Word Food Program, 2015). Mientras que algunos modelos económicos predicen que la población mundial alcanzará un máximo de 9.7 mil millones en 2050, lo que implica que se precise de un aumento en la producción de rumiantes para satisfacer la demanda mundial de proteínas (Huws et al., 2018).

En este sentido, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) predice que la producción agrícola total (incluidos los cultivos vegetales y los animales) tendrá que ser un 60% más alta que en 2005. Por su parte, la demanda de proteínas animales aumenta proporcionalmente a una tasa más rápida, las estimaciones sugieren que la producción mundial de carne y leche tendrá que aumentar en un 76 y un 63%, respectivamente (Alexandratos y Bruinsma, 2012). En el mismo contexto, Gill *et al.*, (2010) describen como los rumiantes son importantes para la conversión de recursos alimenticios que no son comestibles por el hombre en alimentos sanos, saludables y de gran valor nutricional para humanos.

Según la FAO (2016), el sector ganadero representa el 40% del valor mundial de la producción agrícola y favorece los medios de vida y la seguridad alimentaria de casi 1.300 millones de personas. Es uno de los sectores agrícolas de más rápido crecimiento en el mundo. Por todo ello, el crecimiento y la transformación de los sistemas de producción animal pueden contribuir al desarrollo agrícola, la reducción de la pobreza y la mejora de la seguridad alimentaria.

La producción de pequeños rumiantes es de particular importancia en zonas desfavorecidas para los ganaderos pobres debido al bajo coste de la producción, los intervalos cortos entre generaciones y especialmente el valor del animal en venta. Socioeconómicamente, la crianza y posesión de pequeños rumiantes es tanto capital como ahorro para los hogares pobres y su venta contribuye a los ingresos y la cobertura de las necesidades vitales de los hogares rurales. El consumo de la carne de los pequeños rumiantes es aceptada por todas las religiones por lo que implica una mayor demanda de los mismos en países en vías de desarrollo (Cabrera *et al.*, 2009).

Sin embargo, la producción mundial de leche de cabra, valorada en 15 millones de toneladas sigue siendo marginal, y representa una baja proporción de la producción mundial de leche (solo 2%), en gran parte dominado por la leche de vaca (83%) y de búfalo (13%). Por otro lado, la producción mundial de carne de cabra, unos 5 millones de toneladas, es también baja en el variado mundo del sector cárnico y es equivalente a solo el 8% de la carne de vacuno, pero el 60% de la carne de oveja (Lucbert, 2012).

Según Castel *et al.*, (2005), esta baja producción se puede explicar por el hecho de que, la mayor parte de las explotaciones ganaderas de pequeños rumiantes, y en especial de caprino, son de carácter familiar, con un grado de tecnificación y profesionalización muy deficiente. A esto hay que añadir que la mayoría de los sistemas de producción son

semi-extensivos, es decir, que los animales basan su alimentación en pastos, generalmente de mala calidad, y pequeños suplementos de pienso concentrado (Castel *et al.*, 2005).

Sin embargo, dadas sus características fisiológicas, es importante destacar que los rumiantes independientemente de la calidad de alimento que consume produce leche de alto valor nutritivo. La leche de cabra y sus derivados son alimentos que han recibido en los últimos años atención mundial. Su composición difiere de la leche de vaca principalmente en el contenido de caseínas, lo cual propicia mayor rendimiento en la producción de queso y efectos positivos sobre la textura del producto. Los contenidos mayores de ácidos grasos de cadena corta como butírico, caprónico, cáprico y caprílico le confieren un sabor diferente, haciéndolo mucho más digestible al ser humano además de ocasionar menores problemas derivados de la intolerancia a la lactosa (Flores-córdova *et al.*, 2009).

II. EL ANIMAL RUMIANTE

1. Sistema digestivo

El estómago de los rumiantes se sitúa en el lado izquierdo de la cavidad abdominal, ocupando $\frac{3}{4}$ partes del espacio total y se divide en 4 cámaras distintas: rumen, retículo, omaso y abomaso, siendo solo esta última la cámara de digestión ácida (Dehority, 2002). El rumen es la cámara de mayor tamaño, y la más importante funcionalmente, ya que en ella se lleva a cabo la conversión parcial de la biomasa vegetal no digerible en moléculas energéticamente utilizables, especialmente ácidos grasos volátiles (AGV) (Dehority., 2002).

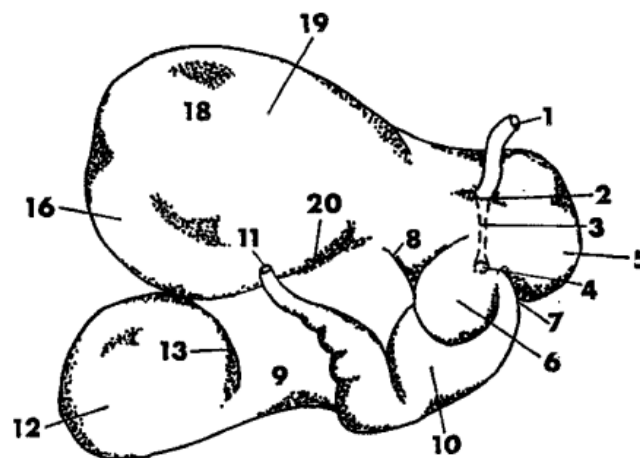


Ilustración 1: Esquema del estómago de los rumiantes. Se diferencia el rumen (19), el retículo (5), omaso (6) y abomaso (10). Fuente: Dehority, 2002

El rumen, el mayor de estos compartimentos, es una gran cámara de fermentación en la que tienen lugar diversas reacciones químicas catalizadas por enzimas microbianas. Este compartimento está constituido por varias cavidades o sacos, separados mediante pilares musculares. La anatomía del rumen tiene una importancia crucial en la degradación de la fibra.

Por un lado, las contracciones de las paredes del rumen posibilitan un buen mezclado de la digesta con la microbiota, lo cual, unido a la disminución del tamaño del alimento por su trituración, potencia la acción fermentativa de los microorganismos. Por otro lado, el tamaño del orificio retículo-omasal permite retener el alimento en el rumen durante un largo periodo de tiempo, asegurando la acción de las enzimas microbianas sobre la fibra (Mackie et al., 1997). El epitelio ruminal es de tipo plano y pseudoestratificado, con numerosas prolongaciones denominadas papilas, a través de las cuales tiene lugar la absorción de diversos productos finales de la fermentación microbiana.

Los productos finales de la fermentación microbiana, que tiene lugar en el rumen, son principalmente ácidos grasos volátiles (AGVs), ácido láctico, masa microbiana, CO_2 , CH_4 , y amonio (NH_3). Los AGV y el NH_3 son absorbidos por las paredes del rumen, el CH_4 es eruptado y el resto de los productos de la fermentación y parte de la masa microbiana pasan al abomaso, donde son digeridos por las enzimas del hospedador. Los microorganismos que llegan al abomaso, fundamentalmente bacterias y protozoos, constituyen la principal fuente de proteína para el animal. De hecho, más de un 70% de los aminoácidos duodenales, dependiendo del tipo de dieta, tienen un origen microbiano (van Soest, 1994). Como resultado de las diversas fermentaciones microbianas, el pH ruminal puede descender considerablemente, impidiendo la actividad de diversas especies de microorganismos, especialmente aquellos que presentan actividad fibrolítica. Para evitar esto, el sistema se tampona eficazmente mediante las sales presentes en la saliva y el bicarbonato disuelto en el líquido ruminal (Counotte et al., 1979).

La fermentación pregástrica presenta 3 ventajas nutricionales (Dehority, 2002):

- i) Los carbohidratos estructurales de la pared vegetal son degradados en el rumen, lo que permite una gran disminución del volumen de materia seca que avanza por el intestino.
- ii) Los microorganismos pueden utilizar nitrógeno no proteico para su beneficio, convirtiéndolo en proteína microbiana disponible para el hospedador.

iii) La síntesis de vitaminas por parte de los microorganismos permite al huésped no depender de su aporte a través de la dieta.

2. Papel de la saliva

En los rumiantes, la saliva juega un papel muy importante, ya que el rumen no tiene secreción propia, y la saliva forma un medio fluido que facilita tanto la ingestión original del alimento como la rumina posterior ya que en la mayoría de ocasiones, el alimento es seco, fibroso y difícil de tragar. En 1961, Bailey estimó en un estudio que entre el 70 y 90% de todo el fluido presente en el rumen procede de la saliva que genera el animal.

La saliva, junto con el agua de bebida, representa el principal aporte de líquido en el rumen, llegando a flujos de entrada de entre 4,22 y 9,05 L/día en ovejas (Duric et al., 1994).

Este hecho, y su alcalinidad debida a las elevadas concentraciones de compuestos inorgánicos como el bicarbonato, y diferentes sales como el fosfato de sodio y de potasio, le permite funcionar como un medio tamponante que favorece el desarrollo de la actividad de microorganismos (Mcdougall, 1948) y proteger el contenido del rumen de la gran cantidad de ácidos grasos producidos por los mismos (Kay, 1966). También, una amplia gama de proteínas contribuye a la regulación del ecosistema ruminal, ya sea mediante la mencionada acción tamponadora (albúmina) o ejerciendo un control sobre la microbiota (lisozima, mucinas, citoquinas e, inmunoglobulinas). Mientras que la lisozima previene la proliferación de bacterias, las inmunoglobulinas, secretadas en la saliva en altas concentraciones (Macpherson et al. 2012), fundamentalmente la inmunoglobulina secretora A (IgA) modulan la microbiota favoreciendo el crecimiento de unas especies e inhibiendo el de otras (Donaldson et al., 2018). Concretamente, se ha comprobado que la IgA puede promover cambios en la composición y actividad microbiana del rumen, lo cual también podría explicar las diferencias observadas entre distintos individuos en cuanto a la composición de su microbiota ruminal (Fouhse et al., 2017).

La saliva contiene también nitrógeno (principalmente en forma de urea) y contribuye al reciclaje del nitrógeno amoniacal procedente del rumen y su posterior transformación en urea en el hígado que se recupera de la absorción de amoniaco en el rumen y posterior transformación al hígado. Dicho reciclaje nitrogenado puede ser muy importante cuando los rumiantes reciben dietas bajas en proteína (Dehority, 2002).

I. EL ECOSISTEMA RUMINAL Y PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN

1. Microbiota del rumen, función y relación con la digestión

El rumen es un ecosistema complejo y dinámico compuesto principalmente por bacterias anaeróbicas, protozoos, hongos anaeróbicos, arqueas metanogénicas y fagos. Estos microbios interactúan entre si y tienen una relación simbiótica con el huésped, lo que proporciona energía a partir de la descomposición de los carbohidratos de la pared celular de la planta que son en gran parte no comestibles para los humanos (Dehority, 2002).

Diversos trabajos desarrollados en la última década han mostrado la relación directa que existe entre la composición de la microbiota ruminal y la eficiencia productiva del animal rumiante. Morgavi et al., (2010) confirmaron que la composición de la población microbiana del rumen influye claramente en la eficiencia de la fermentación, así como sobre la producción de metano. En particular, en el ganado vacuno de leche, Ben Shabat et al., (2016) demostraron que animales con una producción lechera mayor en relación con la ingestión de alimento (1.62 vs. 1.32 kg leche/kg ingesta), la población microbiana es muy distinta presentando una menor diversidad bacteriana, lo que genera un patrón de fermentación ruminal más eficiente (mayor producción de propionato y menor de metano).

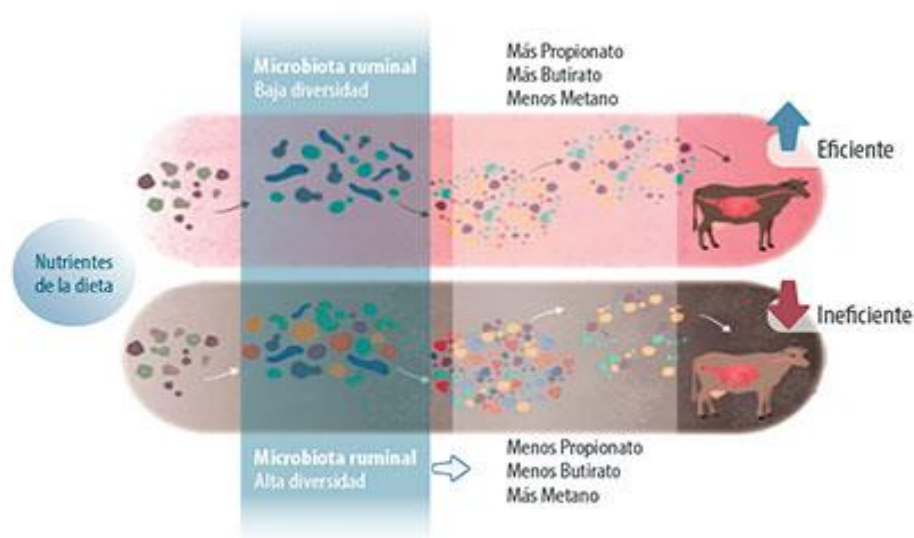


Ilustración 2: Modelo de relación entre eficiencia animal y población microbiana (Ben Shabat et al., 2016)

1.1 Síntesis de proteína microbiana

La mayoría de las bacterias del rumen, principalmente las bacterias celulolíticas, son capaces de usar N-NH_3 en presencia de ATP para sintetizar proteínas a través de dos procesos: uno requiere el uso de glutamina sintetasa y glutamato sintasa (baja concentración de amoníaco y cantidad significativa de ATP), el otro usa glutamato deshidrogenasa e interviene cuando la concentración de N-NH_3 es alta (Leng y Nolan 1984).

Si la concentración de NH_3 no es limitante, la síntesis de proteína microbiana está directamente relacionada con la cantidad disponible en forma de ATP. La eficiencia de la síntesis de proteínas microbianas se mide por la cantidad de materia seca microbiana producida por mol de ATP. Se considera, en general, que la síntesis de un mol de acetato produce 2 ATP; la síntesis de un mol de propionato produce 3 moles de ATP cuando se usa la ruta de succinato, o 1 ATP si se utiliza la ruta de acrilato, la formación de un mol de butirato produce 3 ATP, mientras que la producción de metano es asociada a la producción de un mol de ATP. La síntesis de proteína microbiana se realiza principalmente a partir del ácido acético (Hoover et al., 1963). Además, la eficiencia de síntesis microbiana, expresada por kg de materia orgánica fermentada en el rumen (MOF), varía de 20 a 45 g de N microbiano; siendo el valor de 30 g por kg MOF es el más frecuente.

Distinguimos la "síntesis neta" correspondiente al flujo microbiano duodenal de la "Síntesis total" realizada en el rumen. La diferencia entre estas dos expresiones corresponde a la proteína microbiana que es degradada en el rumen tras la acción depredadora de los protozoos sobre las bacterias y la lisis de una fracción de microorganismos.

Zinn y Owens (1983) señalaron que la predicción de la síntesis de N-microbiana se hace por la medición del flujo de ácidos nucleicos al intestino delgado que permite un alto grado de precisión, sin embargo, requieren de equipos y procedimientos sofisticados. Por eso, se han estimulado la búsqueda de técnicas alternativas para la estimación del flujo de N microbiano que utilicen animales intactos. La técnica de los derivados púricos en orina representa una alternativa simple y no invasiva para estudiar los factores que afectan a la producción de N-microbiano en rumiantes (Balcells et al., 1992).

1.2 Los microorganismos del rumen

La microbiota del rumen está formada por bacterias, protozoos, hongos y arqueas en concentraciones que oscilan entre de 10^4 y 10^{11} células / ml.

1.2.1 Bacterias

El rumen contiene una alta variedad de especies bacterianas, en su mayoría anaerobias (Pitta *et al.*, 2010) que pueden clasificarse en función de su actividad metabólica.

- Bacterias celulíticas

La capacidad de degradar la celulosa depende principalmente del tipo de forraje, madurez del cultivo, y los miembros de las comunidades bacterianas celulíticas (Fondevila y Dehority 1996). El establecimiento y actividad de este grupo bacteriano puede verse afectado por la presencia de ciertos tipos de lípidos en la dieta. Por ejemplo, los lípidos con ácidos grasos de cadena media suelen ser tóxicos para las bacterias celulíticas, reduciendo la digestibilidad de la fibra (Fondevila y Dehority 1996). Este tipo de bacterias se encuentran en concentraciones altas en el rumen de animales alimentados con forrajes que contienen mucha fibra. Muchas de las bacterias de este grupo también degradan el almidón.

- Bacterias hemicelulíticas

Son bacterias capaces de degradar a las hemicelulosas, liberando las pentosas, hexosas y ácidos urónicos, convirtiéndolos en glucosa o fructosa. Muchas de ellas son capaces de degradar además celulosa (Dehority *et al.*, 1967):

- Bacterias amilolíticas

Estas utilizan los almidones como sustrato, pues poseen amilasas que hidroliza enlaces alfa 1-4 produciendo maltosa, que por acción de la maltasa se convierte en glucosa. El almidón es un componente importante de la dieta del ganado y las vacas productoras de leche se alimentan con concentrados que contiene grandes proporciones de granos. Aunque las dietas para rumiantes ricas en almidón son eficazmente fermentadas a AGV que sirven de fuente de energía para el animal hospedador, también la degradación de almidón en el rumen se asocia a trastornos nutricionales como la acidosis ruminal (Gressley *et al.*, 2011).

- Bacterias que utilizan azúcares solubles

Estas se consideran colonizadoras secundarias ya que dependen de la actividad de las anteriores, que son las que producen glucosa, xilosa y otros azúcares solubles a partir de las celulosas, almidones, hemicelulosas, etcétera, transformándolas en ácidos grasos volátiles.

- Bacterias proteolíticas

Producen enzimas hidrolíticas que rompen enlaces peptídicos, liberando péptidos y finalmente ácidos aminados.

- Bacterias lipolíticas

Poseen esterasas que hidrolizan a los triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de ácidos grasos.

- Bacterias que utilizan ácidos.

Actúan sobre los productos finales de la actividad de bacterias de los grupos anteriores, utilizando como sustrato diferentes tipos de ácidos, por lo que ayudan a su eliminación del medio.

Además, hay otros tipos de bacterias capaces de producir amoníaco a partir de los ácidos aminados, por mecanismos de desaminación; las metanogénicas que producen metano a partir de hidrógeno y bióxido de carbono y otras que sintetizan vitaminas. Entre ellas se encuentra un grupo denominado “bacterias superproductoras de amonio” o “hiper-ammonia producing” que han sido objeto de estudio dado sus efectos adversos sobre la eficiencia de utilización del N dietético por parte del animal hospedador.

1.2.2 Los protozoos

Mientras que las bacterias del rumen son las más abundantes numéricamente, los protozoos ruminales, aunque son numéricamente más escasos que las bacterias, dado su mayor tamaño representan una gran proporción de la biomasa microbiana dentro del rumen (aproximadamente entre el 20% y hasta el 50% en algunas condiciones). Los protozoos del rumen fueron descritos por primera vez por Gruby y Delafond en (1843) y junto con los hongos, conforman los miembros eucariotas del rumen de la microbiota del rumen (Newbold et al., 2015).

Los protozoos tradicionalmente se dividen en dos grupos: holotrichos y entodiniomorfos. Los ciliados del rumen son de 20 a 100 veces más grandes en tamaño que las bacterias, pero son 104 veces menos numerosas. Su biomasa en el rumen se distribuye entre las partículas sólidas y la fase líquida (Newbold *et al.*, 2015).

Los rumiantes comúnmente albergan distintas poblaciones de protozoos desde que se establecen durante el desarrollo del rumen varios días después del nacimiento, con solo pequeños cambios en la diversidad a lo largo de la vida, aunque la abundancia de especies fluctúa con los cambios en la dieta (Williams y Coleman, 1997). Por ejemplo, se demostró que *Dastrychia* y *Entodinium* son los géneros predominantes en el líquido del rumen tomado de vacas lecheras y se ha demostrado que *Dastrychia* es más predominante en el líquido del rumen tomado de vacas alimentadas con restos de maíz en comparación con los alimentados con heno de alfalfa y ensilado de maíz (Zhang *et al.*, 2015).

Tabla 1 Principales protozoarios ruminales

Protozoos	productos de fermentación	Referencia
<i>protozoos celulíticos</i>	reductoras de azúcares	(Coleman et al 1976)
<i>Enoploplastron</i>		
<i>triloricatum</i>		
<i>Eudiplodinium maggii</i>		
<i>Diploplastron affine</i>		
<i>Epidinium ecaudatum</i>		
<i>Diplodinium monacanthum</i>		
<i>Diplodinium pentacanthum</i>		
<i>Proteolytic protozoa</i>		
<i>Entodinium caudatum</i>	Amonio AGV	(Ivan et al 2000)
<i>Eudiplodinium medium</i>	Amonio AGV	(Forsberg et al 1984)

La mayoría de los protozoos ruminales y en especial los Entodiniomorfos son depredadores de bacterias ya que estas últimas representan su principal fuente de proteína (Belanche et al., 2012). Por contrario los protozoos Holotricos poseen una menor capacidad predatoria pero una mayor implicación en la producción de metano entérico (Belanche et al., 2015).

Como consecuencia de ello, la completa eliminación de los protozoos del rumen (defaunación) se ha demostrado que posee efectos positivos sobre la eficiencia de utilización de la proteína dietética, así como sobre las emisiones de metano, si bien la digestión de la fibra puede verse ligeramente comprometida (Newbold et al., 2015).

1.2.3 Hongos

Los hongos representan una pequeña proporción, aproximadamente 8%, de la biomasa en el ecosistema ruminal. (Jenkins *et al.*, 2008), pero tienen un papel en la digestión de los alimentos fibrosos consumidos por el rumiante (Nam y Garnsworthy, 2007). Las poblaciones de hongos ruminales son favorecidas por el consumo de forraje fibroso principalmente lignificado.

Los hongos ruminales están presentes en el duodeno, el ciego, y las heces y se eliminan cuando los rumiantes son alimentados alto concentraciones de azúcares rápidamente fermentables; sin embargo, los hongos proliferan rápidamente una vez que la concentración de alimento incrementa (Grenet et al 1989).

Tabla 2 Los principales hongos ruminales

Hongos anaerobios	Productos de fermentación	Referencia
<i>Neocallimastix frontalis</i>	Lactato, formato, acetato, succinate, etanol	(Moniello et al 1996)
<i>Piromyces communis</i>	Celobiosa, oligosacaridos	(Dashtban et al 2009)
<i>Orpinomyces joyonii</i>	Glucosa	(Hodrova et al 1995)

1.2.4 Arqueas

Todas ellas son metanogénicas y su concentración oscila entre 10^7 y 10^9 células/ml en función de la proporción de fibra que contenga la dieta (Kamra, 2005). Estos procariotas son los responsables de la producción de metano a partir de CO_2 , acetato y compuestos con grupos metilo (Liu y Whitman, 2008) siendo predominante la ruta que utiliza CO_2 y H_2 como donador de electrones (hidrogenotróficos). Las clases más abundantes en el rumen son *Methanobacteria* (70,3% de las secuencias analizadas), *Methanomicrobia* (16,4%) y *Thermoplasmata* (7,4%). Dentro de la primera, el género más abundante es *Methanobrevibacter*, que supone el 50% de las secuencias de arqueas del rumen (Kim *et al.*, 2011).

2. Fermentación y degradación de nutrientes en el rumen

Los microorganismos ruminales obtienen la energía por medio de la fermentación del alimento y su transformación en AGV, que son posteriormente aprovechados por el animal. Durante este proceso fermentativo, los AGV son rápidamente absorbidos en el rumen y utilizados como fuente de energía, mientras otros productos como el hidrógeno

(H₂) y el dióxido de carbono (CO₂) son utilizados por los microorganismos del rumen, pertenecientes al dominio Archaea para producir CH₄, el cual es liberado al exterior por el eructo y la expiración (Pechin, 1999).

Hay distintos tipos de fermentación, clasificados según los productos finales obtenidos. Distinguimos la fermentación homoláctica, que al igual que la que se produce en el músculo en ejercicios violentos, en el rumen produce lactato como consecuencia de la acción enzimática microbiana de los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus*.

Estos microbios producen láctato-deshidrogenasa que transforma ácido pirúvico en ácido láctico. También hay fermentación heteroláctica donde la mitad de la glucosa fermentada es convertida en ácido láctico y el resto aparece como CO₂, alcohol, ácido fórmico y ácido acético. Se da en el género *Leuconostoc* y en algunos *Lactobacillus*. Otro tipo de fermentación es alcohólica que se da en levaduras. Así que existe fermentación propiónica donde el género es *Propiobacterium*. Los géneros de fermentación butírica son *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Fusobacterium* y *Eubacterium*. Y al final existe una fermentación mixta, donde los productos finales son ácidos láctico, acético, succínico, fórmico y etanol, los géneros son *Escherichia*, *Shigella* y *Salmonella*.

Para comprender cómo el rumiante hace uso de los hidratos de carbono (HC) de su dieta es necesario recordar que la célula vegetal posee componentes estructurales (pared celular), como celulosa, hemicelulosa, lignina y una proporción menor de pectina, cutina y proteínas. En su interior, la célula contiene una serie de HC solubles, especialmente mono y disacáridos que, aunque se hallan en un % menor, cumplen un rol importante en el proceso global de la fermentación ruminal, ya que junto con el almidón soluble (en el caso de utilizar granos) proveen la energía rápidamente fermentable para los microorganismos.

- **Degradación de carbohidratos no fibrosos**

- Azúcares

Los azúcares pueden provenir de los alimentos directamente, o de la hidrólisis de polisacáridos. Estos son degradados generalmente en forma rápida por los microorganismos, favoreciendo a la producción de ácido propiónico fundamentalmente. Raciones ricas en azúcares pueden determinar presencia de ácido láctico en rumen. (Kaufmann, 1976).

- Almidón y otros polisacáridos solubles

El almidón es importante en raciones ricas en concentrados, seguido por una disminución del pH ruminal, lo que lleva a la modificación del complejo de microorganismos, adaptándose estos a una fermentación amilolítica. En estas condiciones se observa un aumento en la proporción de ácido propiónico. Otro polisacárido importante es la pectina, la cual es rápidamente degradada, con importante producción de ácido acético. Parte de los polisacáridos solubles pueden quedar, luego de su hidrólisis, como sustancias de reserva de los protozoarios. Bacterias importantes en estos compuestos son *Streptococcus bovis* y *Ruminobacter amylophilus* (Kaufmann, 1976).

• Degradación de Carbohidratos fibrosos

La fibra se considera que agrupa los componentes de la pared celular, pero según el método de extracción utilizado agrupará distintos componentes (Van Soest, 1982). Se distingue la Fibra Neutro Detergente: material insoluble en solución detergente neutra, se compone de celulosa, hemicelulosa, lignina y puede contener residuos de almidón, cenizas y nitrógeno. La Fibra Ácido Detergente que es material insoluble en solución detergente ácida, está constituida por celulosa y lignina, aunque puede contener residuos de nitrógeno y minerales. Por su parte, la fibra bruta es el material insoluble en solución ácida, seguida por una alcalina, y está constituido por celulosa, aunque puede contener residuos de hemicelulosa, lignina y compuestos nitrogenados.

- Celulosa

La celulosa está compuesta por 1 4 beta poliglucósidos, con un alto grado de polimerización. Son importantes en raciones ricas en fibra. La flora que se encuentra degradando la misma se encuentra adherida a las fibras vegetales, y el desarrollo de este tipo de flora se encuentra relacionado con niveles de pH por encima del mencionado para la degradación amilolítica. Se puede observar que el complejo enzimático que desdobla la celulosa no se encontrará en la fase líquida del rumen. Se ha demostrado en ensayos que el mayor contenido de fibra en la dieta del animal favorece la producción de ácido acético. (Kaufmann, 1976)

La degradación de la celulosa en el rumen es realizada por bacterias celulolíticas, por algunos géneros de protozoos celulolíticos y por hongos anaerobios. La digestión de los

tejidos vegetales tiene lugar en forma progresiva y secuencial. Las bacterias penetran inicialmente por las estomas y las fracturas creadas por la molienda y la masticación del alimento. La mayor parte de la colonización se da en la superficie interior de la pared celular. Trabajando allí, las colonias de bacterias quedan protegidas de la predación de los protozoos y de la competencia por los nutrientes por parte de otras especies bacterianas.

Las fases de la degradación de la celulosa empiezan por la desagregación que se realiza por acción de las celulasas C1, que atacan los puentes de H de la celulosa y dan por resultado una rápida pérdida de tensión de la fibra. Pasando por la hidrólisis extracelular, en esta fase actúan las celulasas Cx, que son enzimas extracelulares. Son endo y exo B 1-4 glucosidasas. Las exo B 1-4 glucosidasas remueven las unidades celobiosas a partir del extremo no reductor de las cadenas de celulosa. Las endo B 1-4 glucosidasas atacan las uniones internas al azar. Originan oligosacáridos que contienen 3 a 7 unidades de glucosa. Luego actúan las celodextrinasas, que originan, por su acción hidrolítica, glucosa y celobiosa. La fase siguiente es el metabolismo intracelular; las bacterias celulolíticas prefieren la celobiosa a la glucosa, como nutriente. La celobiosa penetra por medio de un transportador. En el interior de la célula (en la membrana o en el citoplasma) actúa la celobiosa fosforilasa, que cataliza la siguiente reacción de fosforólisis:

celobiosa -----» glucosa + glucosa 1P

Esta organización permite a las bacterias poder utilizar muy eficazmente la glucosa y la celobiosa liberadas en el curso de la hidrólisis de la celulosa. Finalmente, la glucosa liberada es metabolizada por las bacterias, pudiendo, incluso, una parte, ser almacenada en el citoplasma bajo la forma de glucógeno. Los protozoos ciliados entodiniomorfos (de los géneros *Entodinium*, *Polyplastron*, *Epidinium*, *Metadinium*, *Eudiplodinium* y *Diplodinium*) atacan los hidrocarbonatos parietales de una manera diferente a la de las bacterias. Los protozoos ingieren las fibras vegetales y luego las mismas son incluidas en vacuolas digestivas. Allí son degradadas por sus propias enzimas celulolíticas. Los hongos anaerobios, los cuales colonizan abundantemente los tejidos ligno-celulósicos de los vegetales, se encuentran exclusivamente en los ecosistemas digestivos de los rumiantes. Poseen un aparato enzimático, asociado a la pared fúngica, que les permite degradar una serie de hidratos de carbono, entre ellos celulosa y hemicelulosa.

- Hemicelulosa

Los procesos de degradación de la hemicelulosa son similares a los de la celulosa. Bacterias importantes en estos compuestos son *Fibrobacter succingenes*, *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens*, entre otras. (Kaufmann, 1976)

- Lignina

Los procesos de degradación de este compuesto lo realizan bacterias aerobias, y dado el bajo contenido de oxígeno en el rumen, su degradación es casi nula (Kaufmann, 1976)

- Degradación de proteína

Las necesidades de los microorganismos se pueden cubrir con fuentes de nitrógeno proteico y no proteico, en cambio, las necesidades del animal se pueden cubrir con aminoácidos, que pueden ser de origen microbiano o dietético no degradado en el rumen. El perfil y la calidad de los aminoácidos que llegan al duodeno es diferente del aportado en la ración, debido a la degradación ruminal de los aminoácidos dietéticos y al aporte de proteína microbiana, sintetizada a partir de la energía derivada de los carbohidratos y de compuestos nitrogenados simples (Wallace y Cotta, 1988). Esta proteína microbiana junto con la proteína que escapa de la degradación ruminal es directamente disponible para ser digerida y absorbida por el rumiante tras su paso por el rumen.

3. Producción de ácidos grasos volátiles

3.1 Origen de los ácidos grasos volátiles

Las fuentes de producción de ácidos grasos volátiles son varias. Los carbohidratos constituyen la fuente principal de energía y por lo tanto contribuyen a la producción de ácidos grasos volátiles. La proteína de la dieta también puede contribuir a esta producción, especialmente en aquellas raciones con un contenido proteico elevado. Su participación es a través de la degradación de los ácidos aminados hasta metabolitos capaces de convertirse en ácidos grasos volátiles. Por ejemplo, el ácido glutámico y el aspártico se metabolizan con gran rapidez y producen ácidos grasos volátiles y CO₂ (Forrest et al., 1971)

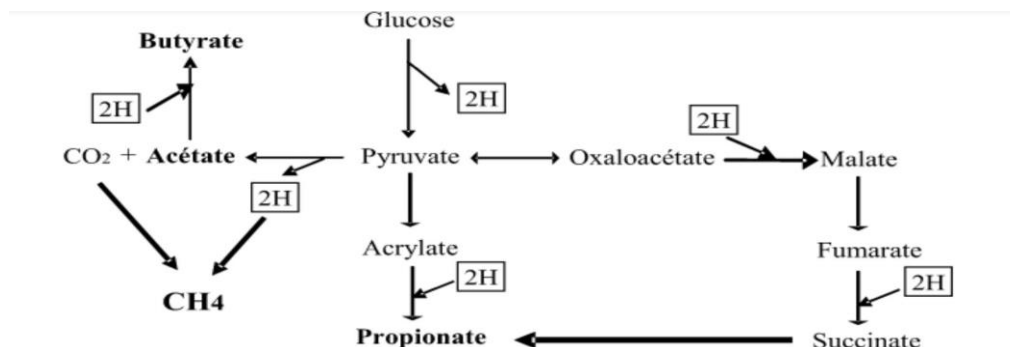


Ilustración 3: la formación de ácidos grasos volátiles (Jean Pierre Jouany et Pierre Thivend. 2008)

Los productos que se obtienen al final del proceso fermentativo dependen, en parte, del tipo de microorganismos presentes en un momento dado en el rumen, sin embargo, los que resultan más importantes son el ácido acético, el propiónico y el butírico, entre los ácidos grasos volátiles, además del láctico, el succínico, el etanol, el metano, CO₂, hidrógeno y ácido sulfhídrico. Todos ellos se obtienen a partir de la glucosa o fructosa que se liberan de los distintos carbohidratos y que fermentan las bacterias siguiendo la vía catabólica del glucolisis. Uno de los compuestos clave en este proceso degradativo es el ácido pirúvico que aparece en concentración baja en el líquido ruminal a partir de lo cual se obtienen los distintos ácidos grasos volátiles. Durante el proceso de fermentación, los ácidos grasos volátiles sufren procesos de inter-conversión, así podemos observar que 40 a 80% del ácido butírico deriva del acético y de 6 a 20% del acético proviene del butírico (Weston et al., 1968).

Los AGV son productos finales de la fermentación microbiana y son absorbidos a través de la pared del rumen. La mayoría del acetato y todo el propionato son transportados al hígado, pero la mayoría del butirato se convierte en la pared del rumen a una cetona denominada [beta]-hidroxibutirato (Ilustración 4). Sabiendo que las cetonas son la fuente principal de energía (combustible) para la mayoría de los tejidos del cuerpo (Cook et al., 1965).

3.2 Factores que afectan la producción de ácidos grasos volátiles

En el rumen, la producción de los AGV depende de la composición de la ración, la actividad microbiana, el pH del medio y la frecuencia de ingestión de alimentos. En general, las raciones a base de forraje producen menos cantidad de ácidos grasos volátiles, en contraposición con aquellas a base de concentrados de alto contenido en proteína o carbohidratos fácilmente fermentables. La proporción molar de ácido acético

es elevada, entre 60-75%, cuando se suministran raciones a base de forraje o pastos sin picar. El ácido propiónico varía entre 15 y 19% y el butírico sufre variaciones más amplias, 8 a 16%. Además, con estas raciones hay una pérdida considerable de la energía consumida, energía que se pierde bajo la forma de metano (Blaxter et al., 1964). Si el forraje se da al animal finamente picado, la proporción de ácido acético se ve disminuida en relación con los otros ácidos. (Bath et al., 1965).

En caso de introducción de una gran cantidad de concentrado, sin un periodo previo de adaptación, se puede provocar una acumulación de ácido láctico en el rumen provocando la acidosis. En general, el aumento en ácido propiónico se observa cuando la cantidad de concentrado adicionada es elevada y su composición es a base de granos con gran cantidad de almidón (Bath et al., 1965).

3.3 Utilización de los ácidos grasos volátiles

Los ácidos grasos que se liberan en el rumen son aprovechados en parte por las bacterias, que los utilizan para sintetizar algunos componentes estructurales. La síntesis de proteína microbiana se realiza a partir del ácido acético, algunas bacterias sintetizan los ácidos grasos de cadena larga a partir del isobutírico, n-valérico y n-caproico principalmente. El resto es absorbido en su mayoría a través de la pared ruminal (76%) realizándose por medio de difusión simple, es decir, siempre que el gradiente de concentración sea favorable para ello. El orden de absorción es lo siguiente; butírico, propiónico y acético al final. Y la absorción aumenta cuando el pH del rumen es más bajo. Aquellos AGVs que no son absorbidos en el rumen pasan al amaso y abomaso en donde con una tasa de absorción es 19% y tan solo 4 a 5% llegaba a pasar al intestino.

En la sangre que proviene de las paredes del rumen aparecen los ácidos; acético, propiónico, láctico y pequeña cantidad de butírico, así como cuerpos cetónicos; todos estos productos son llevados “via porta” al hígado para su posterior metabolismo (Cook et al., 1965). En el hígado, el ácido propiónico es el único que interviene en gluconeogénesis, por ello, bajo ciertas condiciones alimenticias se puede producir un déficit de glucosa. La proporción de glucosa que se puede obtener a partir del ácido propiónico varía entre 19 y 62% dependiendo de la velocidad de producción de ácido en el rumen (Steel et al., 1973). Por lo tanto, las necesidades de glucosa tienen que ser cubiertas por medio de la gluconeogénesis. Una gran proporción del ácido propiónico es oxidado hasta CO₂ y energía, haciéndolo entrar en el ciclo de Krebs bajo la forma de

Succinil-CoA. Además, este ácido interviene en la síntesis de grasa, pero esto esencialmente bajo la forma de glucosa.

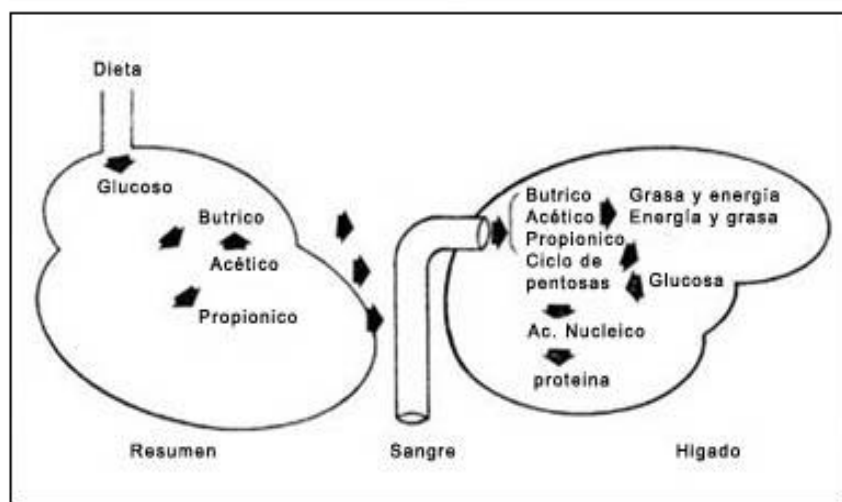


Ilustración 4: Diagrama del metabolismo de los ácidos grasos volátiles del licor ruminal

La pequeña cantidad de butírico que escapa del metabolismo en el epitelio ruminal se utiliza en el hígado, junto con los ácidos grasos de cadena larga que se producen en el rumen durante la fermentación, intervienen en la producción de grasas complejas o bien es oxidado produciendo radicales acetiles que se utilizan en ciclo Krebs para producir CO_2 y energía.

Por su parte, el ácido acético, el láctico y los cuerpos cetónicos especialmente el ácido beta-hidroxibutirato, salen del hígado sin haber sufrido ningún cambio y constituyen los sustratos utilizables por los tejidos extra-hepáticos. Los cuerpos cetónicos son utilizados con facilidad por la mayoría de los tejidos de los rumiantes. Excepto el hígado, cerebro y epitelio ruminal. En la glándula mamaria el ácido beta-hidroxibutirato se utiliza como fuente de energía. La eficiencia en el aprovechamiento de la energía proveniente de los ácidos grasos volátiles aplicada en la producción es mucho menor que la de la glucosa.

4. Producción de CO_2 y metano

La formación de CH_4 en el rumen es un proceso fisiológico normal que contribuye al correcto funcionamiento fermentativo del rumen, contrarrestando la inhibición de otros microorganismos provocado por la acumulación de H_2 (Kumar et al., 2014). Hay tres sustratos principales utilizados por las arqueas metanógenas para producir metano: CO_2 , compuestos que contienen un grupo metilo o acetato (Liu y Whitman, 2008).

En el rumen, la vía predominante es la hidrogenotrófica utilizando CO_2 como fuente de carbono y H_2 como principal donante de electrones (Hungate, 1967). Yañez-Ruiz et al., (2008) indicaron que no hay una relación clara entre el número de metanógenos y metanogénesis en el rumen, aunque sí existe una correlación más consistente entre el número de protozoos y producción de metano. En este sentido, un solo protozoo puede producir entre 0.5 y 4.5 nmol H_2 / día, lo que se asocia con una producción de metano que varía desde cantidades mínimas de hasta 3 nmol / día (Ushida y Jouany, 1996; Tokura et al., 1997). No todos los géneros de protozoos tienen el mismo papel en la metanogénesis y a pesar de su importancia, todavía hay poca información sobre la contribución individual a las emisiones de metano. En el rumen *Entodinium sp.* fue identificado como el mas importante genero de protozoos que contribuye a la emisión de metano dado su elevada abundancia en el rumen (Ranilla et al., 2007). Mientras que Belanche et al., (2013) sugirieron que los protozoos holotricos parecen tener un papel fundamental en la metanogénesis ruminal dado la presencia de hidrogenosomas y arqueas endosimbióticas.

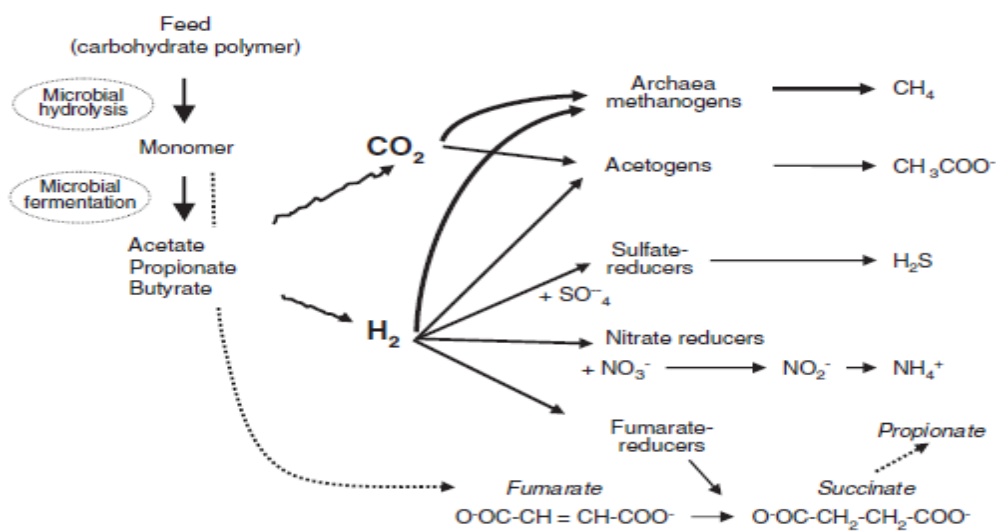


Ilustración 5 Schematic microbial fermentation of feed polysaccharides and H_2 reduction pathways in the rumen.

1. pH del rumen

Varios trabajos muestran que la concentración bacteriana es más alta en animales alimentados con dieta que lleva una tasa importante de concentrado, indicando que el número de bacterias aumenta con la disponibilidad de energía (Krause y Oetzel, 2006). No obstante, otros estudios indican que los animales que se alimentan de dieta basada en forraje tienen más bacterias ruminales. La explicación de esta diferencia entre resultados puede ser la variación de la cantidad de concentrado y forraje que ingiere el animal, la frecuencia y nivel de alimentación, la hora de muestreo y también a un efecto del animal. Por otro lado, es probable que el volumen total del contenido ruminal juegue un cierto papel, de hecho, que los animales alimentados con mayor cantidad de forraje presentan mayor tamaño del rumen, puede tener un efecto de dilución de la masa microbiana. (Dehority y Orpin 1997).

La ingestión de dieta con elevada tasa de concentrado incrementa la producción de AGV y disminuye el pH. Un rumen con pH muy bajo constituye un medio hostil para las bacterias celulolíticas (Stewart et al., 1997). Aunque ciertos autores no han encontrado cambios significativos en sus densidades cuando el pH baja de forma gradual e incluso cuando este alcanza un nivel muy bajo (Palmonari et al., 2010). Un pH ruminal bajo conduce a una actividad de bacterias celulolíticas muy limitada y por lo cual una reducción de la digestibilidad de fibra (Mouriño et al., 2001). También, la acidificación del contenido ruminal afecta el crecimiento de los hongos (Kamra et al., 2003). En el caso de una fuerte y rápida bajada de pH, puede limitar también el crecimiento de los protozoos (Látal et al., 2007), pero si el descenso es lento y gradual puede ser en favor de los protozoos, se multiplican mejor debido a la mayor disponibilidad de carbohidratos solubles. Por el contrario, las dietas fibrosas estimulan el crecimiento de bacterias celulolíticas y de hongos (Kamra et al., 2003), y generan mayor cantidad de acético, y por lo tanto de hidrógeno, que en consecuencia pueden estimular el crecimiento de microorganismos metanógenos (Van soest, 1994).

En el control del pH ruminal, la saliva juega un papel importante ya que aporta aproximadamente la mitad del bicarbonato que ingresa al rumen (Owens et al., 1998), que ayuda a tamponar el pH del rumen debido a la alta producción de ácidos durante la fermentación. La saliva es producida por las glándulas salivales que existen alrededor de la cavidad bucal. Las glándulas que producen el mayor volumen de saliva son las parótidas y glándulas morales inferiores (que producen saliva serosa), seguida de las glándulas mixtas submaxilares, sublinguales y labiales (con secreción serosa y mucosa)

y finalmente las glándulas mucosas (bucal y palatina). La mezcla de estas secreciones da el volumen total de saliva (Hcard's Dairyman, 2006). El tipo de la dieta afecta la producción de saliva y por lo tanto el pH ruminal. En este contexto, Maekawa, et al., (2002) confirmaron que, para alimentos con un tamaño de partícula pequeño, como concentrados, se agrega menos saliva por unidad de DM porque se requiere una pequeña reducción del tamaño de partícula para formar un bolo. Así, los concentrados se tragan mucho más secos que los forrajes. Los forrajes son masticados más extensamente para reducir el tamaño de partícula del alimento ingerido, lo que resulta en un aumento en la cantidad de saliva añadida por unidad de materia seca. Las diferencias en la tasa de insalivación entre los alimentos pueden ser atribuido a las diferencias en el tiempo de destinado a la ingestión debido a que la tasa de secreción de saliva por minuto es similar. En este sentido, la tasa de insalivación fue mayor para ensilaje que para concentrado porque el ensilaje fue consumido más lentamente que el concentrado (Maekawa, et al., 2002).

II. DESARROLLO DEL RUMEN

Al nacimiento los rumiantes son considerados pre-rumiantes debido al escaso desarrollo funcional del retículo-rumen que les confiere una fisiología digestiva similar a la de los monogástricos. Por ello, el animal lactante precisa de una progresiva transición de pre-rumiante a rumiante que permita el desarrollo del retículo-rumen de manera adecuada para poder prepararse a la ingestión de alimento sólido. Dicho desarrollo implica tres procesos simultáneos, pero claramente diferenciados; un desarrollo anatómico del rumen, desarrollo microbiológico y desarrollo fisiológico.

1. Desarrollo anatómico

Este proceso implica el incremento de tamaño del órgano y de las papilas ruminales (Reynolds *et al.*, 2004). y a su vez ocurre en 3 fases (Lane *et al.*, 2002): no rumiante (hasta las 3 semanas tras nacimiento), de transición (3-8 semanas) y rumiante (de 8 semanas en adelante).

Durante el nacimiento y en las tres primeras semanas de vida, el pre-rumiante apenas utiliza los tres primeros compartimentos gástricos (rumen, retículo y omaso); su desarrollo demora algún tiempo y está en dependencia de que el animal ingiera un pienso seco adecuado; entre tanto es necesario suministrarle leche o un sucedáneo lácteo líquido apropiado. Durante la primera fase de vida el alimento líquido se dirige

directamente al cuarto compartimiento gástrico (abomaso), aquí se coagula y la digestión prosigue, como en los monogástricos. Es necesario proporcionar al recién nacido un pienso adecuado y durante las tres primeras semanas de edad, porque su aparato enzimático no está adaptado a dirigir alimento sólido fibroso (Stewart, 1974). El tamaño del rumen-retículo aumenta rápidamente tan pronto los animales ingieren alimentos secos, demostrando que el crecimiento relativo se alcanza probablemente a las 12 semanas (Church, 1974).

El epitelio ruminal es muy complejo con distintas capas celulares que se van diferenciando y ascendiendo hacia la luz ruminal. Las células del estrato basal tienen gran capacidad metabólica con grandes vesículas, ribosomas, mitocondrias y las células superficiales están queratinizadas ofreciendo una buena protección frente a la abrasión (Figura 7). Al nacimiento las papilas ruminales están bien desarrolladas, son de tamaño pequeño pero su número es muy elevado, posiblemente porque durante la vida fetal reciben la estimulación a través de los AGV de la sangre materna (Tamate y col., 1962). Durante la fase de lactante sufren una cierta regresión y no se desarrollarán totalmente hasta que no se inicie el consumo de alimento sólido, al igual que la capa muscular, cuya función es mezclar el contenido y movilizarlo a través de todo el tubo digestivo. Aunque durante la etapa de lactante el retículo-rumen haya aumentado de tamaño, sus paredes siguen siendo flácidas y poco funcionales.

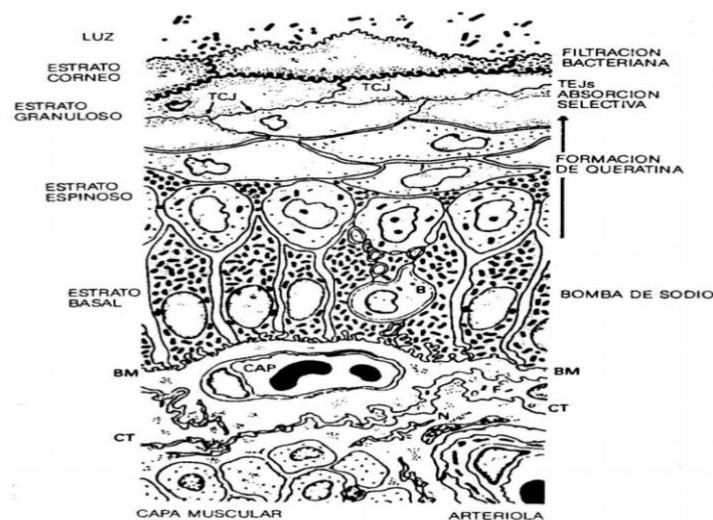


Ilustración 6: Diagrama de la sección transversa de la pared ruminal totalmente desarrollada

2. Desarrollo fisiológico

Este proceso implica la adquisición de una capacidad fermentativa y enzimática capaz de digerir los alimentos en el rumen. (Faubladier *et al.*, 2013). Las principales actividades enzimáticas (fibrolíticas, amilolíticas, proteolíticas y ureolíticas) de la microbiota ruminal se han observado en el rumen tan pronto como día 4 (Sahoo *et al.*, 2005) o día 10 de edad (Kmet *et al.*, 1986).

Rey *et al.*, (2012) indicaron que las principales actividades fermentativas y enzimáticas que tienen lugar a partir del día 2 se estabilizan alrededor de 1 mes de edad. Las actividades enzimáticas fueron máximas entre los días 10 y 23 después del nacimiento y fueron variables hasta el destete. El medio ruminal es fuertemente aeróbico al nacimiento y se vuelve anaeróbico entre el día 2 a 83 de edad, probablemente reflejando la actividad microbiana y la dinámica de la fermentación. Además, se ha observado que el medio ruminal de terneros recién nacidos (día 1) carece de AGV y de actividades xilanasas y amilasas, así como muy baja concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ y actividad proteolítica (Rey *et al.*, 2012)

3. Desarrollo microbiológico

Este proceso consiste en la progresiva colonización ruminal por parte de los grupos microbianos más relevantes como bacterias, protozoos, hongos anaerobios y arqueas metanógenas. En rumiantes, tras el nacimiento y durante esta primera fase de desarrollo se produce un incremento importante en la masa microbiana ruminal (Abecia *et al.*, 2014). En el mismo contexto, Rey *et al.*, (2014) concluyeron que la comunidad bacteriana ruminal se establece antes de la ingesta de alimentos sólidos, pero la llegada de alimentos sólidos a su vez da forma a esta comunidad. Sin embargo, Alipour *et al.*, (2018), sugieren que los mamíferos son colonizados intra-uterinamente por una población microbiana diversa que es detectable en el momento del nacimiento, pero los cambios rápidos de microbiota en la vida postnatal temprana parecen ser mucho más importantes.

Los primeros inóculos microbianos se transmiten verticalmente de la madre a la descendencia (Funkhouser, *et al.*, 2013) y la colonización mayor comienza al nacer y se complementa durante la lactancia y en la vida posterior (Power *et al.*, 2017). En una revisión reciente Yáñez-Ruiz *et al.*, (2015) describen cómo el rumen es rápidamente colonizado por todo tipo de microorganismos inmediatamente después del nacimiento y el patrón de colonización puede ser influenciado por varios factores tales como la

presencia o ausencia de animales adultos, el tipo de dieta o la suplementación con microorganismos probióticos como levaduras. Uno de los trabajos que describen con mayor detalle el establecimiento de una comunidad bacteriana ruminal en rumiantes lactantes desde el nacimiento hasta el destete (Rey et al, 2014) mostraron que en el día 2, la comunidad bacteriana estaba compuesta principalmente por Proteobacterias (70%) y Bacteroidetes (14%), y Pasteurellaceae era la familia dominante (58%). La comunidad bacteriana cambió bruscamente entre los días 2 y 3, y hasta el día 12, los géneros dominantes fueron *Bacteroides* (21%), *Prevotella* (11%), *Fusobacterium* (5%) y *Streptococcus* (4%). De 15 a 83 días, cuando la ingesta de alimentos sólidos aumentó rápidamente *Prevotella* se volvió dominante (42%) y muchos géneros disminuyeron fuertemente o ya no se detectaron. Un número limitado de géneros de bacterias se correlacionaron con la ingesta de alimento, los ácidos grasos volátiles y las actividades enzimáticas (Figura 7)

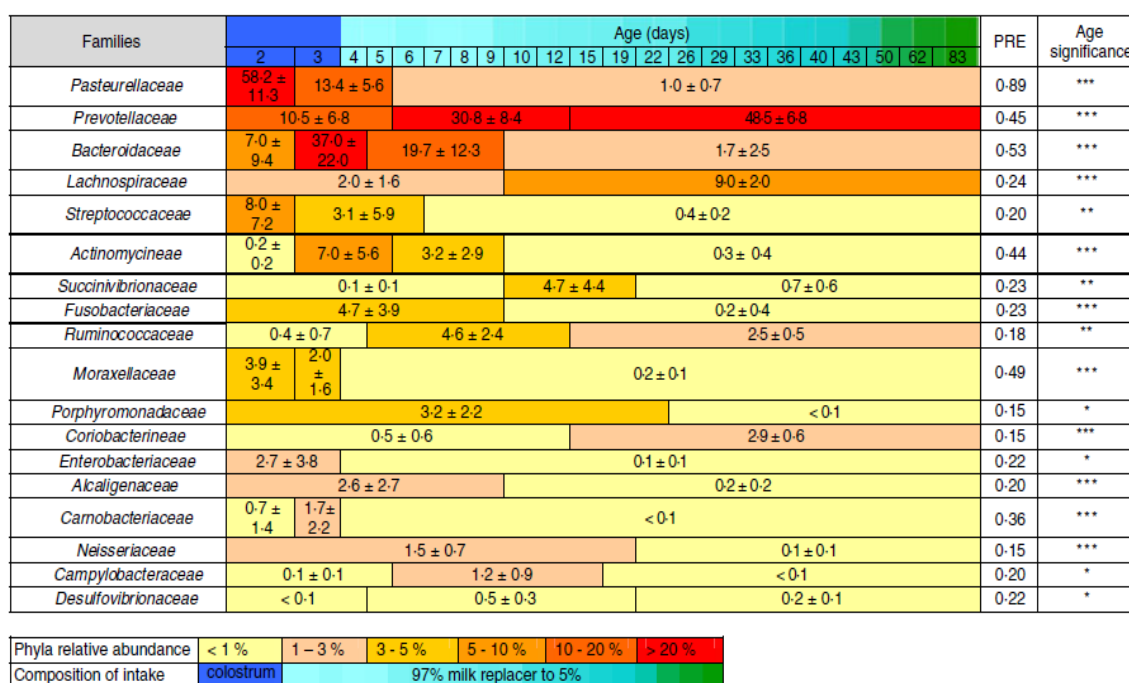


Figura 7: Patrón de establecimiento de diversos grupos bacterianos en el rumen en desarrollo de terneros

Aunque existe un componente genético importante que determina la composición de la microbiota; sin embargo, con estrategias alimenticias adecuadas se puede también modular la composición microbiana hacia una situación de mayor eficiencia (Huws et al., 2018). Eso lo que han demostrado Yáñez-Ruiz *et al.*, (2015) indicando que las intervenciones aplicadas desde el nacimiento pueden modificar el patrón de

colonización ruminal y la respuesta fisiológica del animal, persistiendo algunos efectos en el adulto.

V. FACTORES QUE DETERMINAN EL DESARROLLO RUMINAL

El rumen tiene un crecimiento innato potencial, ya que se ha demostrado un incremento absoluto en el volumen y el peso del tejido incluso en animales alimentados con dieta líquida a base de leche (Warner, 1961). En la tabla siguiente se aprecia el desarrollo del rumen-retículo del bovino en función de la edad, según Church (1974):

Tabla 3: desarrollo del rumen-retículo del bovino en función de la edad

edad(semanas)	0	4	8	12	20-26	34-38
rumen-retículo (g)	38	52	60	64	64	64

Sin embargo, existen una serie de factores que modulan dicho crecimiento ruminal:

1. Tipo de lactancia (artificial -patrón de suministro- o natural), tipos de destete presencia/ausencia adultos
 - Efecto de tipo de lactancia y tipos de destete sobre el desarrollo ruminal

Se ha sugerido que la naturaleza del calostro y la leche recibida por los animales recién nacidos podría modular la colonización microbiana del rumen (Yeoman *et al.*, 2018), pero su persistencia más adelante en la vida sigue siendo desconocida. En el mismo contexto, y para ver el efecto del tipo lactancia sobre el desarrollo ruminal, Belanche *et al.*, (2018) demostraron que los corderos criados con lactación artificial no tenían protozoos y niveles más bajos de *Bacteroides* al destete en comparación con los corderos que recibieron lactación natural. Determinaron también, que la crianza natural con la oveja aceleró la colonización del rumen en términos de mayor diversidad microbiana y actividad fermentativa que podría favorecer el proceso de destete. Así que los animales a crianza natural (calostro y leche de la madre), al destete (45 días) producen más butirato y más AGV. También mostraron que el manejo posnatal (alimentación con alternativa de calostro en lugar de calostro de oveja) alteró el desarrollo de las comunidades microbianas del rumen hasta 45 días, pero no después. Los corderos criados naturalmente retuvieron varias características microbiológicas de larga duración relacionadas con la población ruminal de hongos (mayor diversidad y

abundancia de *Feramyces* y *Piromyces*), metanógenos (más *Methanobrevibacter gottschalkii*) y comunidades de protozoos (más *Diplodiniinae*), así como una mayor complejidad de la comunidad microbiana.

- Presencia/ausencia adultos sobre el desarrollo ruminal

La cohabitación de animales adultos junto a animales jóvenes durante sus primeras semanas de vida se ha descrito que puede favorecer a los animales jóvenes en dos aspectos: i) el aprendizaje social de los neonatos y ii) la transmisión de la microbiota de adultos a los pequeños

- i) En cuanto al componente social, comprender el impacto de las interacciones sociales en el bienestar y la productividad del ganado es crucial para la implementación de mejores prácticas agrícolas. Los recuerdos recuperados de eventos emocionalmente críticos en edades tempranas pueden influir en el estado emocional y el comportamiento de los animales en el futuro (Mendl y Held 2001). En este sentido, Galef (1977) mostró que la ingesta de dieta sólida de terneros jóvenes aumentaba cuando estaban en compañía de un compañero adulto y propuso que eso podría ser el resultado del aprendizaje social. Además, Galef y Giraldeau, (2001) añadieron que los animales jóvenes parecen más dependientes del aprendizaje social para localizar y seleccionar alimentos comestibles que los adultos. Así mismo, la presencia de adultos parece modificar el patrón alimentario de animales jóvenes promoviendo una mayor frecuencia de visitas al comedero (De Paula et al. 2012), El aprendizaje social de la alimentación puede ser particularmente beneficioso antes y después del destete, el período en que las crías hacen la transición de una dieta a base de leche a una alimentación sólida (Passillé *et al.*, 2011).

Independiente de la imitación, la estimulación olfativa, también puede influir el consumo del alimento. Por ejemplo, en ratas, cierta información sobre el alimento se transfiere entre individuos a través de los olores del alimento en el aliento del animal demostrador (Galef, 1994); Los terneros jóvenes también pueden haber sido influenciados por los olores del heno y del iniciador en el aliento del compañero mayor, lo que los llevó a experimentar con alimentos de olores similares.

ii) Además, la presencia de un compañero adulto también podría actuar a modo de inóculo microbiano aumentando la disponibilidad de microorganismos en el ambiente, permitiendo una inoculación temprana de la microbiota en el tracto digestivo de los animales jóvenes (De Paula et al. 2012). En otro trabajo de Abecia et al., (2014) se estudió el efecto del manejo de la alimentación (lactancia natural o artificial) sobre la colonización microbiana y la fermentación ruminal, en el que se observó una concentración bacteriana más alta en el rumen de los animales en el grupo acompañado de las madres (tomando leche natural) pero una concentración de arqueas similar entre los dos grupos. Dado su ausencia de pared bacteriana y su anaerobiosis estricta, los protozoos ruminales precisan de contacto directo entre un animal donante y uno receptor para que su transmisión se haga efectiva. Por ello, se ha observado una concentración muy baja de protozoos en el rumen de animales aislados (lactancia artificial), efecto ya descrito en animales aislados en estudios anteriores ya que la única de inoculación de protozoos en el rumen es a través del contacto directo con animales faunados (Yáñez-Ruiz et al. 2007). En este sentido, el agua de bebida compartida entre ambos animales parece ser la principal vía de transmisión de protozoos ruminales (Bird *et al.*, 2010).

2. Ingestión de alimento sólido

La abundancia de distintas especies de la comunidad microbiana ruminal varía fundamentalmente en función de la dieta que recibe el animal (Henderson et al., 2015). La ingestión de alimento forrajero en gran cantidad provoca una mayor salivación y por tanto el aumento del pH, por lo tanto, favorece una proliferación de bacterias fibrolíticas. Por el contrario, una dieta que lleva concentrado en gran proporción aumenta el número de microorganismos amilolíticos (Goad et al., 1998). El desarrollo posnatal del estómago de los rumiantes guarda relación con el tamaño y/o la edad pero también con la dieta recibida durante edades tempranas. Una dieta líquida retrasa el desarrollo del rumen-retículo, tanto en el grosor y peso de los tejidos como en el desarrollo papilar. El desarrollo normal determina un crecimiento rápido del rumen-retículo después que el animal comienza a ingerir alimentos sólidos. El consumo de alimentos groseros poco fermentables (e.g. paja) estimula el crecimiento de la pared ruminal; esto se aprecia por el aumento de grosor de los tejidos, aunque la presencia de productos o alimentos fermentables que originan AGV actúan como factor necesario para la maduración de las papilas (Suárez et al., 2007). En el mismo contexto, Roy (1980) confirmaron que una restricción en el aporte de leche durante la lactancia tardía

estimula el consumo de alimentos sólidos y el desarrollo de los pre-estómagos. Si los terneros tienen acceso a cantidades decrecientes de leche, aproximadamente a los 7 días de vida comenzarán a consumir alimentos sólidos.

Experimentos de Perón y Ruiz en 1972 concluyen que la dieta es el factor fundamental y determinante de la morfología de la pared ruminal. El peso y el volumen de la ingesta son factores determinantes del volumen del rumen, pero no de la morfología de su pared. Una dieta líquida retrasará el desarrollo ruminal, el peso de los tejidos y el desarrollo papilar. Mientras que una dieta a base de alimentos groseros poco fermentables ejerce estímulos mecánicos que estimulan el crecimiento y el desarrollo de la musculatura ruminal, aunque la presencia de productos que originan AGV es un factor necesario para la maduración papilar (Castro-Flores 2012). De manera similar, Zitnan *et al.*, (2003) determinaron un aumento en la superficie de absorción en el rumen, duodeno y yeyuno en los animales que reciben dieta rica en alimento concentrado. Este hecho fue confirmado por la correlación positiva entre la morfometría de los parámetros de la mucosa ruminal e intestinal (Zitnan *et al.*, 2003). Como consecuencia de ello, podemos decir que el tipo de alimento recibido por el rumiante tras el nacimiento, no solo determina el desarrollo anatómico, fisiológico y microbiológico del rumen, sino que también puede tener consecuencias en la función del tracto digestivo posterior (e.g. intestino delgado e intestino grueso).

3. Empleo de aditivos

Debido a la prohibición del uso de antibióticos como promotores del crecimiento en la producción ganadera en Europa en 2006, se han empezado a desarrollar estrategias nutricionales a base de aditivos alimentarios de distinta naturaleza para cambiar la fermentación del rumen hacia un metabolismo más eficiente (Patra, 2010). Sin embargo, la efectividad de tales estrategias nutricionales parece limitada, ya que los resultados son a menudo inconsistentes o de corta duración debido a la alta redundancia y resiliencia de la microbiota del rumen (Weimer, 2015). Estos factores dificultan la modificación de un ecosistema microbiano bien establecido y completamente maduro en el rumen de animales adultos (Zhou *et al.*, 2018).

Varios estudios han sugerido que es posible modificar el patrón de colonización microbiana del rumen en animales jóvenes a través de diferentes estrategias nutricionales de la vida temprana (Yanez-Ruiz *et al.*, 2015, Abecia *et al.*, 2017). En este sentido, el rumen es colonizado en la primera semana de vida, mucho antes de que

comience la ingesta de alimento sólido, y que alcanzan concentraciones similares a las del rumen adulto tras el primera mes de vida (Abecia et al., 2014). Esta colonización tan temprana representa una oportunidad de intervención en cuanto a la ocupación de distintos nichos ecológicos y la tolerancia inmunitaria del animal a los microorganismos que colonizan, asumiendo que hasta que el ecosistema se coloniza y estabiliza hay una ventana de tiempo con una alta plasticidad que permita cierta manipulación y, sobre todo, que los cambios producidos permanezcan en el animal adulto.

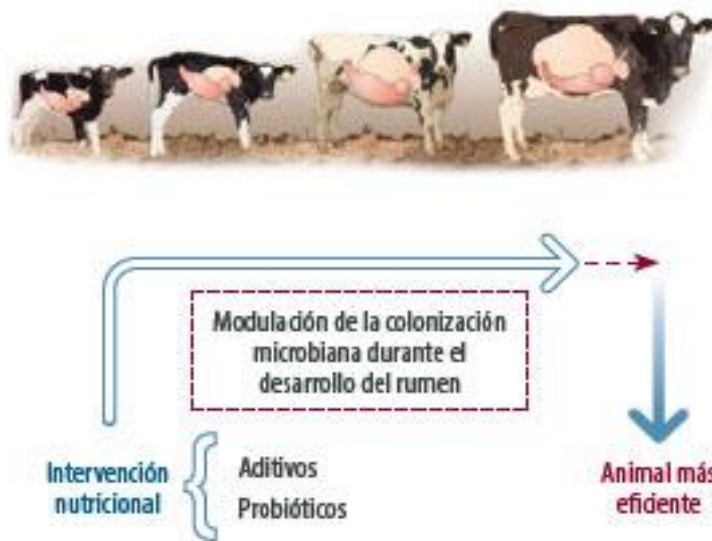


Ilustración 8: Concepto de programación microbiana del rumen.

Los probióticos (o Direct-Fed Microbials) están cobrando cada vez más importancia en el sector como alternativa al uso de antibióticos (Buntyn *et al.*, 2016). Los objetivos primordiales del uso de probióticos en la nutrición animal son mantener e incluso mejorar el rendimiento del animal (en términos de producción y crecimiento) a la vez que se ejerce un control sobre los patógenos entéricos evitando que estos se extiendan en el tracto gastrointestinal (FAO, 2016).

Los probióticos, a diferencia de los antibióticos y de otros aditivos alimenticios son, según la definición oficial de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO), “microorganismos vivos que, al administrarse en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador” (FAO/WHO, 2001). Estos se

pueden clasificar atendiendo a varios criterios, entre los que destacan, primero, si el probiótico es bacteriano o de otro origen, generalmente, fúngico, o bien si se trata de una mezcla de cepas o especies o de sólo una de ellas, y si el probiótico es autóctono o alóctono del tracto gastrointestinal en función de si el microorganismo inoculado se ha aislado o no de dicho ecosistema microbiano (FAO, 2016).

Por ejemplo, la administración de levaduras en el rumen ejerce un efecto positivo sobre algunas bacterias consumidoras de lactato como *Selenomonas ruminantium* y *Megasphaera elsdenii* (Pinloche et al. 2013) lo que alivia las caídas bruscas del pH ruminal. Su uso también ha comenzado a aplicarse a animales lactantes para modificar la población microbiana que coloniza el, rumen (Muya et al., 2015) con resultados variables. Recientemente Abecia et al. (2017) han mostrado que la administración de levaduras a crías de cabra durante la lactancia les permite mantener un pH ruminal en valores más óptimos cuando estos animales alcancen la madurez y entran en lactación.

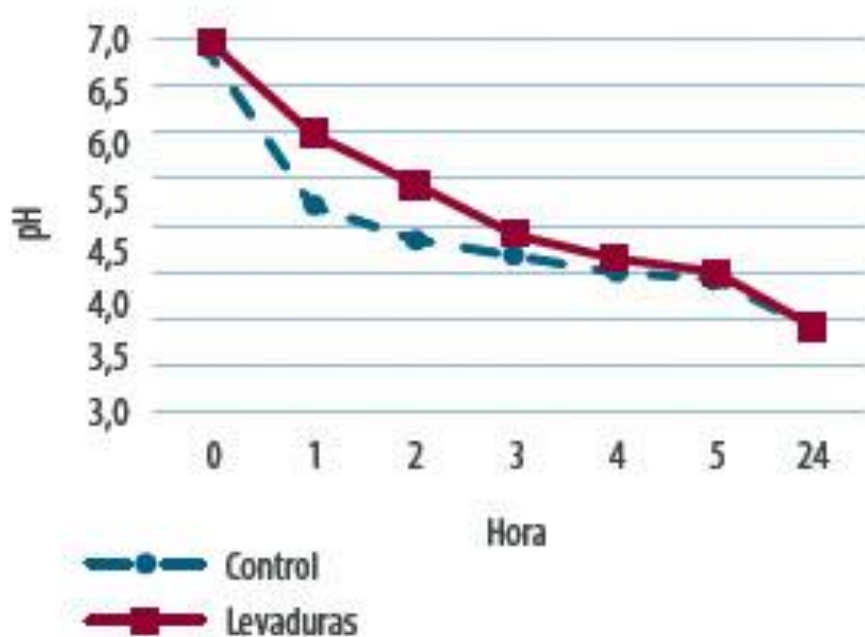


Ilustración 9: Efecto de administración de levaduras en edades tempranas sobre la disminución del pH ruminal en cabras lecheras

El principal modo de acción de probióticos es la modificación de la dinámica poblacional del tracto gastrointestinal mediante la modulación del equilibrio entre los

microorganismos beneficiosos y los potencialmente dañinos lo que, a la postre, genera una comunidad microbiana más favorable (Mountzouris *et al.*, 2009).

La modulación de la microbiota gastrointestinal por probióticos más común es aquella en la que se incrementan las poblaciones de *Lactobacillus* y *Bifidobacteria*, comúnmente atribuidas al grupo de microorganismos favorables, además de disminuir las de algunos coliformes como *Escherichia coli* y *Clostridium* spp (Cao *et al.*, 2013). Las poblaciones microbianas beneficiosas se asocian frecuentemente con una mejora en la eficiencia digestiva del animal, así como en la inmunidad del mismo (Hung *et al.*, 2012).

El butirato es la fuente de energía primaria para las células epiteliales del rumen y los colonocitos, que son mediadores importantes de la absorción de agua, minerales y nutrientes (Edford *et al.*, 2017). Por ello, el butirato también se usa como aditivo en los terneros para el desarrollo ruminal Khan *et al.*, 2011), especialmente administrado antes de las tres semanas de edad, fomentando cambios en los factores endocrinos (insulina, IGF-I) cuando se promueve el consumo de mayores cantidades de leche y factores de crecimiento encontrados en el calostro (Elizondo 2007). Así, la suplementación de butirato de calcio en la alimentación de terneros ejerció efectos positivos sobre la altura de las vellosidades del intestino delgado (Moreira *et al.*, 2016). En un ensayo similar O'Hara *et al.*, (2018) añadieron butirato de sodio al lacto-reemplazante de terneros desde los días 7 a 56 de vida. Dicho ensayo demostró que los efectos beneficiosos del aditivo sobre el crecimiento y la eficiencia digestiva se producen en conjunto con los cambios en la abundancia de importantes bacterias productoras de ácido graso de cadena corta (SCFA) y asociadas a la salud intestinal de terneros lactantes.

4. Procesamiento de alimentos

Las intervenciones físico-químicas que se ejercen sobre el alimento durante el procesamiento de las materias primas incrementan el área superficial de exposición microbiana e incrementan la digestibilidad del almidón a nivel ruminal (Huntington 1997), y por lo tanto pueden tener una influencia sustancial en el funcionamiento del rumen. Así por ejemplo, Murphy *et al.*, (1994) reportaron un incremento en la producción total de AGV cuando los granos de maíz entero fueron reemplazados con maíz chafado. Por su parte, Joy *et al.*, (1997) y Crocker *et al.*, (1998) demostraron un incremento en la producción de propionato al someter los granos a un proceso de calor,

mientras que la producción de butirato incrementó por el procesamiento físico (Murphy *et al.*, 1994). Por ello, es importante comprender que la alteración de la forma física del alimento puede tener una influencia sustancial en la función ruminal, digestibilidad y consumo, ya que durante el procesamiento de los granos, se aumenta el área superficial disponible para que los microorganismos ruminales puedan adherirse y atacar (Huntington 1997, Beharka *et al.*, 1998). Sin embargo, el procesado de los cereales puede hacerlos rápidamente degradables en el rumen originando un descenso excesivo del pH ruminal e incluso inducir un proceso de endurecimiento del epitelio ruminal (para-queratosis) que dificulta la absorción de productos de fermentación (Lesmeister y Heinrichs 2005).

La forma de presentación de la dieta (harina vs pellet) parece no afectar al desarrollo de los compartimentos estomacales ni el grosor de la pared ruminal, pero si al tamaño de las papilas (Suárez *et al.*, 2006). Además, la inclusión de butirato en el lacto-reemplazante o en el alimento sólido tiene efectos beneficiosos tanto en el desarrollo intestinal como en el crecimiento animal en el ganado joven (Xu *et al.*, 2016).

III. EFECTOS E IMPLICACIONES PRODUCTIVAS A LARGO PLAZO DE LOS FACTORES ANTERIORES

Todos los factores descritos anteriormente afectan al desarrollo anatómico, fisiológico, microbiológico del rumen en animales jóvenes, sin embargo, hasta la fecha no se conoce fehacientemente cuál es la persistencia de dichos efectos a largo plazo y cuáles pueden ser sus implicaciones productivas. En un trabajo reciente Belanche *et al.*, (2018) compararon corderos que recibieron bien lactancia natural o lactancia artificial para valorar las implicaciones microbiológicas y productivas a corto (al destete) y largo plazo (fase de pastoreo). Este ensayo demostró que a pesar de que todos los animales alcanzaron un mismo peso al destete (45 días de edad), los alimentados con lactancia natural presentaban un mayor grado de desarrollo ruminal (e.g. presencia de protozoos y mayor diversidad microbiana). Como consecuencia de ello, los animales con lactancia natural presentaron un mayor crecimiento durante la fase de pastoreo a pesar de que todos los animales fueron alimentados con el mismo pasto.

A pesar de los efectos duraderos potenciales de alterar el ecosistema microbiano del rumen, los cambios inducidos durante la vida temprana pueden alterar el crecimiento en animales jóvenes. Los datos recientes también muestran que el 22% de la variación en el rendimiento de la leche en la primera lactancia está asociada a la ganancia diaria

promedio durante las primeras semanas de vida (Soberon *et al.*, 2012), por lo que una correcta alimentación y desarrollo ruminal en esta etapa es vital para no comprometer su futuro potencial productivo. Aunque el número de estudios que analizan la manipulación de la dieta de los rumiantes en la vida temprana está aumentando, muy pocos han estudiado la persistencia de dichos efectos y sus implicaciones productivas durante en el animal adulto, aspecto que es objeto de estudio en el presente trabajo.

2. OBJETIVOS

1. Comparar el efecto de la presencia o ausencia de animales adultos con los cabritos tras el nacimiento y durante la lactancia artificial plazo sobre:

- El crecimiento
- La colonización microbiana en el rumen
- El desarrollo ruminal

2. Estudiar la eficiencia digestiva de los animales a largo plazo (9 meses de edad) con dos dietas de distinta naturaleza:

- Dieta alta en concentrado (80% Concentrado y 20% Forraje)
- Dieta 100% Forraje

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño experimental

Se emplearon 18 cabritos recién nacidos de raza Murciano-Granadina, los cuales permanecieron con su madre durante las 24h posteriores al parto, durante las cuales se alimentaron de calostro materno. A partir de ese momento, se alimentaron con lacto-reemplazante y se distribuyeron aleatoriamente en 2 grupos experimentales con un peso medio inicial similar en ambos grupos y con el mismo número de hembras que de machos. Uno de los grupos (CTL) se mantuvo aislado completamente de otros animales hasta el final del ensayo. El segundo grupo (ADL) estuvo en contacto continuo con dos cabras adultas diferentes a sus madres hasta 6 meses de edad.

El experimento se desarrolló en dos fases:

- i) Una en la que se evaluaron los efectos de la presencia de adultos a corto plazo durante la fase pre y post-destete.
- ii) Y una segunda fase que consistió en evaluar la persistencia de dichos efectos a largo plazo mediante el empleo de retos alimenticios a base de dos dietas experimentales diferentes (alta en concentrado o forraje)

Durante el período de lactancia y crecimiento los animales se pesaron semanalmente y se recogieron muestras de contenido ruminal y sangre a la edad de 5, 7 y 9 semanas para el estudio de la fermentación ruminal, colonización microbiana y desarrollo del rumen.

La retirada de animales adultos en el grupo ADL se hizo a 6 meses de edad, los dos grupos experimentales se mantuvieron separados físicamente y alimentados a base de pienso de crecimiento y heno de avena ad libitum.

A la edad de 9 meses se llevó el estudio de la respuesta digestiva de los animales teniendo en cuenta dos factores:

Factor 1: presencia/ausencia de adultos.

- a) **CTL:** Grupo control, los animales de este grupo son aislados de adultos desde el nacimiento hasta el fin del experimento.
- b) **ADL:** Grupo tratamiento, los animales de este grupo fueron acompañados de 2 adultos diferentes a sus madres desde el día 2 de vida hasta 4 meses de edad.

Factor 2: tipo de dieta ofrecida en edad adulta

- a) dieta alta en concentrado (CC) a base de 80% concentrado y 20% Forraje.
- b) dieta alta en forraje (F) a base de 100% Forraje.

Se llevó a cabo un **experimento de digestibilidad** dividido en dos fases:

+ **Fase1:** 3 semanas basadas en alimentación con concentrado y forraje (CC)

Se controló el comportamiento de los animales, se estimó la ingestión voluntaria de los animales y se realizó una oferta del 95% de dicha ingestión máxima de modo que media y se ajustó la cantidad de concentrado y forraje para llegar a una proporción 80:20. Tras el ajuste de la dieta se hizo prueba de digestibilidad durante una semana en jaulas metabólicas, seguida de recogida de muestra del contenido ruminal y sangre al final de la semana.

+ **Fase 2:** 3 semanas durante las cuales los animales se alimentan a base forraje **únicamente** (F) a base de heno de avena picado de 5 a 8 mm de tamaño.

Se dedica una semana para la adaptación al forraje con alimentación *ad libitum* y otra para determinar la ingesta de forraje únicamente. En la tercera semana se llevó a cabo una prueba de digestibilidad durante una semana y se recogieron muestras de contenido ruminal y sangre al final de la semana.

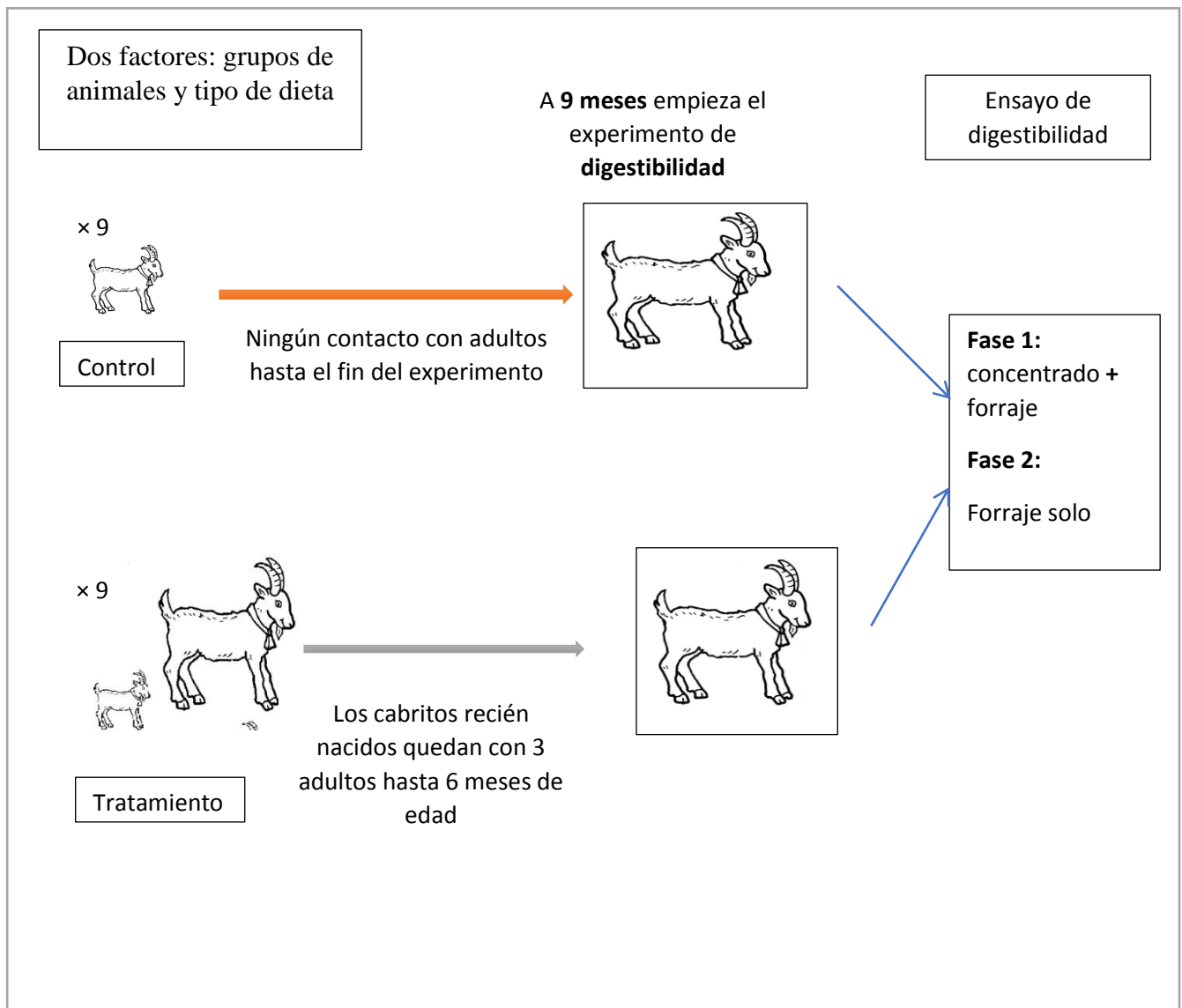


Ilustración 10: Esquema del diseño experimental

3.2 Digestibilidad

Se alojaron los animales en las jaulas metabólicas para poder determinar el rehusó del alimento (forraje y concentrado en fase 1 y solo forraje en fase 2), la cantidad de heces y orina totales. Además, se midió el pH de la orina para comprobar que era lo suficientemente bajo para evitar la degradación de urea a amonio o la pérdida de derivados púricos.

Para la orina diariamente se recogen muestras (50g) que se congelaban a -20°C para su posterior análisis de derivados púricos.

Para las heces se recoge 20% de heces totales /animal / día y se guardó -20°C, para posteriormente liofilizar y determinar materia seca y contenido en nutrientes.

Determinación la ingesta

Los animales se alojan en el establo en boxes individuales, los tres primeros días de cada reto alimentario (CC y F) se procedió a ofertar el alimento *ad-libitum* y pesar el rehuso para determinar la capacidad de ingestión de forraje y de concentrado respectivamente. Tras ello, se procedió a ofertar el 95% de la capacidad de ingestión media en cada una de las fases con el objetivo de obtener una misma ingestión para ambos tratamientos y evitar efectos de confusión entre el plano de alimentación y el tratamiento objeto de estudio (presencia de animales acompañantes).

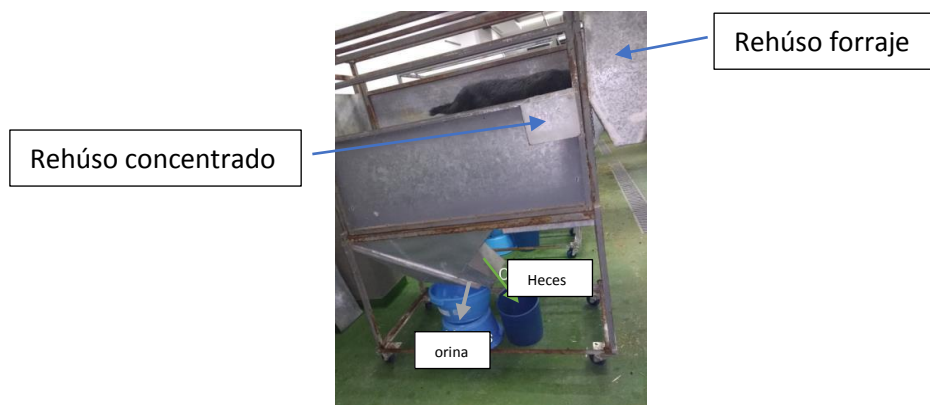


Ilustración 11: Jaula metabólica



Ilustración 12: Una muestra de pool de orina



Ilustración 13: Muestras de heces individuales

3.2.1 Componentes fibrosos

a. Determinación de la materia seca y materia orgánica

- Materia seca

Se determina como la pérdida de peso que experimenta una muestra tras ser sometida a desecación, durante un periodo de tiempo adecuado a $103 \pm 1^\circ\text{C}$, en estufa de ventilación forzada según el protocolo establecido por la Association Official Analytical Chemists (AOAC 1984).

- Materia orgánica

Las cenizas totales se obtienen por calcinación de 1 a 2 gramos de muestra, en horno mufla a 550°C durante 5 horas. El contenido en materia orgánica se determina por diferencia entre 100 y el contenido porcentual de cenizas totales en la muestra referido a materia seca.

3.2.2 Determinación de la fibra

La técnica de la fibra detergente, desarrollada en 1963 en la Universidad de Cornell por el Dr. Peter J. Van Soest. El principio de esta técnica es basado a sus componentes que son los siguientes, la Termoestable α -amilasa es el componente que hidroliza el almidón, Lauril sulfato de sodio (SLS) forma complejos solubles con las proteínas, Trietilenglicol elimina el material soluble no fibroso, EDTA evita la formación de matrices de calciopectina insolubles y, así, disuelve la pectina y para mantener un pH 7 y evitar la hidrólisis de la hemicelulosa Borato se añade el tampón fosfato.

- Fibra Neutro Detergente FND

Es una medición de la hemicelulosa, celulosa y lignina representando toda la parte fibrosa del forraje. Estos 3 compuestos representan las paredes celulares de los forrajes

y se denominan en general como “carbohidratos estructurales”. El contenido de FDN de las dietas o forrajes se correlaciona en forma negativa con el consumo de alimento.

El material celular soluble se extrae, por ebullición de la muestra durante 1 hora, en una solución de detergente neutro de lauril sulfatos sódico que contiene EDTA disódico. Los componentes solubles, fácilmente utilizables desde el punto de vista nutritivo, se separan de aquellos cuya fermentación microbiana requiere un tiempo más prolongado.

El material insoluble en detergente neutro y libre de cenizas constituye la Fibra Neutro Detergente (FND). Los materiales solubles en detergente neutro o contenidos celulares se obtienen por diferencia entre 100 y el contenido porcentual de FND de la muestra, expresado con relación a la materia seca.

- Fibra Ácido Detergente FAD

Es la cuantificación de la celulosa y la lignina. A medida que el contenido de lignina aumenta la digestibilidad de la celulosa disminuye; por lo tanto, el contenido de FDA se correlaciona negativamente con la digestibilidad total del insumo evaluado.

FAD corresponde a residuo, constituido fundamentalmente por lignocelulosa, que se obtiene tras someter la muestra a una digestión con solución de detergente ácido (bromuro de cetiltrimetilamonio) en medio sulfúrico y posterior calcinación a 550°C, en horno mufla.

El contenido en hemicelulosa se obtiene por diferencia entre los contenidos porcentuales de fibra neutro y ácido detergente de la muestra expresado en materia seca.

- Lignina Ácido Detergente LAD

La lignina es un componente indigestible de los forrajes. Mientras más madura es una planta más alto es su contenido de lignina, y por ende menos digerible.

LAD es la fracción de la pared celular, constituida fundamental, aunque no exclusivamente, por lignina. El saco que contiene el residuo que resulta de la incubación de la muestra con detergente ácido, se sumerge en ácido sulfúrico al 72% durante 3 horas. Pasado este tiempo, se lavan los sacos con agua destilada caliente hasta que el pH del agua de lavado sea neutro, se aclaran con acetona, se desecan al aire y se completa la disecación, en estufa de ventilación forzada entre 103±1°C finalmente, se pesan y se incineran en horno de mufla a 550°C. La celulosa se obtiene por diferencia entre los

contenidos porcentuales de fibra Acido Detergente y Lignina Acido Detergente de la muestra correspondiente, expresados en relación con la materia seca.



Ilustración 14: Puesta de crisoles con muestras en horno de mufla y cenizas obtenidas al final

3.2.3 Determinación de la digestibilidad

Se colecta el rehúso de alimento de cada animal durante cada reto (se hace un pool de alimentos rechazos durante 4 días en jaulas metabólicas por cada reto), se muele y se pesa muestra de 5g de cada pool siguiendo, se pone en bolsas F57 Filter Bags (Ankom Technology). Luego, pasan al análisis de materia seca y de fibra.



Ilustración 15: Bolsas F57 Filter Bags (Ankom Technology)

La digestibilidad aparente es evaluada a partir de la digestibilidad ileal y/o heces. Con este método no se conoce la proporción de la proteína que proviene de la dieta o de la secreción de nitrógeno endógeno (NE), y solo permite asumir que cantidad del alimento fue asimilado por el animal.

Digestibilidad aparente de MS = $((\text{cantidad de M.S. ingerida} - \text{cantidad de M.S. excretada})) / \text{cantidad de M.S. ingerida} * 100$

La **digestibilidad verdadera** de la MS se calculó teniendo en cuenta el contenido en FND del residuo tras la incubación, de tal modo que la expresión matemática para la misma sería (van Soest et al., 1966):

$$(\text{MS ingerida} - \text{FND residual}) / \text{MS ingerida} * 100$$

3.3 Productos de fermentación ruminal

Incubación in vitro; durante cada fase se recogieron muestras del líquido ruminal de cada animal empleando una sonda esofágica para medir la producción de CH₄. También las muestras del líquido ruminal se emplearon para determinar la concentración de AGV por cromatografía de gases y NH₃-N por espectrofotometría. Además, se recoge una alícuota para extracción de ADN y posterior cuantificación de la abundancia de bacterias, protozoos, arqueas.

3.3.1 Producción de AGV

Previo al muestreo de contenido ruminal, se prepararon dos soluciones:

-Solución 1 (S1): 10,35 ml de HCl al 37%, a los que se añaden 0,2 g de Ácido Crotonico y 5g de Ácido Metafosfórico. Esto se llevó hasta 250 ml rellenando con agua destilada. El crotonico, ausente en los animales, ejerce el papel de patrón interno debido a que su respuesta en el cromatógrafo de gases se asemeja a la de los AGV que se pretenden medir. La función del Ácido Metafosfórico es la de desproteinizar las muestras.

-Solución 2 (S2): solución diluida de S1. Se mezclan 50 ml de S1 con 50 ml de agua destilada.

Tras esto se procedió a preparar los patrones de AGV con los que comparar. Para ello, se añadieron 25 ml, aproximadamente, de S2 en un matraz y en el mismo se fueron añadiendo los volúmenes de AGV presentes en la **Tabla 4**. Tras ello se enrasó con S2 hasta llegar hasta 50 ml y se agitó. Esta primera mezcla constituye el patrón A.

Tabla 4: Volúmenes de AGV a añadir para elaborar el patrón

Ácidos Grasos Volátiles (AGV)	Volumen (µL)
Acético	170
Propiónico	80
Isobutírico	40
Butírico	80
Isovalérico	40
Valérico	40

A continuación, se prepararon el resto de patrones como se indica en la **Tabla 5**

Tabla5: Preparación de patrones para determinación de AGV

		Para 5 ml	
	Proporciones	Volumen Patrón A (ml)	Volumen S2 (ml)
Patrón B	75% A + 25% S2	3,75	1,25
Patrón C	50% A + 50% S2	2,5	2,5
Patrón D	25% A + 75% S2	1,25	3,75
Patrón E	20% A + 80% S2	1	4
Patrón F	10% A + 90% S2	0,5	4,5
Patrón G	5% A + 95% S2	0,25	4,75
Patrón H	2,5% A + 97,5% S2	0,125	4,88

Una vez preparados, los patrones se pasaron a viales y se conservaron a -20°C junto con S2 hasta el momento del análisis.

En el día de muestreo de contenido ruminal, se prepararon tubos con 800 µl de la S1 y a cada tubo se le añadieron 800 µl de contenido ruminal. De esta forma se diluye la concentración de los AGV de las muestras a la mitad, al igual que ocurre con el patrón A que hemos preparado. Las muestras se congelaron -20°C junto con los patrones preparados el día de antes. El último paso fue medir los AGV de las muestras en un cromatógrafo de gases *AutoSystem* (Perkin Elmer, Waltham, MA, EEUU) para así obtener la cantidad de cada AGV y la total. Para ello, tanto muestras como patrones se descongelaron y se centrifugaron durante 20 minutos a 4°C y 4000 rpm. El sobrenadante resultante se pasó a viales de cromatografía y estos se congelaron para estabilizar y poder separar precipitados que pudieran aparecer. En el momento en que se iban a hacer

las medidas se descongelaron los viales y se extrajo su contenido a través del *septum* con una jeringa, pasándose este al cromatógrafo de gases. Junto con las muestras y los patrones también se introdujeron “blancos” a base de metanol. En el cromatógrafo de gases se utilizaron la columna y las condiciones descritas por Supelco (1990): columna de vidrio SP-1220 de 1,83 m de longitud y 4 mm de diámetro interno, 145°C de temperatura, detector de conductividad térmica y nitrógeno como gas portador (con un flujo de 70 mL/minuto).

En el ordenador conectado al cromatógrafo se pudieron observar los picos de respuesta de cada AGV en las muestras y sus concentraciones, calculadas a partir de la recta obtenida con los patrones. Con estos datos se pudo calcular la cantidad de AGV totales y la proporción de cada uno sobre el total.

3.3.2 Determinación de N-NH₃

Para la determinación de N-NH₃ del contenido ruminal, primero se llevó a cabo la fijación de las muestras con una solución de HCl 0,5N. Concretamente se tomaron 0,8 ml de cada muestra y se pasaron a tubos con el mismo volumen (0,8 ml) de la solución de fijación de HCl. Las muestras fueron congeladas a -20°C durante, al menos, 48 horas. Paralelamente se prepararon los reactivos necesarios y las soluciones utilizadas para generar una recta patrón con la que comparar:

-Solución madre: Se secó (NH₄)₂SO₄ en una estufa a 103°C durante 1 h y se pasó al desecador para, una vez frío, Preparar una dilución 1:100 (1ml de **sulfato de amonio 1M** en 99ml de 0.05M H₂SO₄). Esta solución se diluyó 100 veces para obtener la “solución hija” o también Estándar S₀

Reactivo A: 13g de NaOH+4g **Sodio EDTA** en 1L con H₂O_d.

Reactivo B: 10g Phenol+0.057g **Nitroprusiato de sodio** en 1L con H₂O_d.

Reactivo C: 5g NaOH+10ml **solución hipoclorito de sodio** (abrir lejía nueva) en 1L con H₂O_d.

Tabla 6: Preparación de los estándares de análisis de amonio

S0 dilución 1:100 “solución hija”	1ml de sulfato de amonio 1M en 99ml de 0.05M H₂SO₄
S1	H ₂ Od (0 µg N/ml)
S2	1ml estándar S₀ hasta 50ml con H ₂ Od: 0.2mM (5.6 µgN/ml)
S3	2ml estándar S₀ hasta 50ml con H ₂ Od: 0.4mM (11.2 µgN/ml)
S4	3ml estándar S₀ hasta 50ml con H ₂ Od: 0.6mM (16.8 µg N/ml)
S5	4ml estándar S₀ hasta 50ml con H ₂ Od: 0.8mM (22.4 µg N/ml)

Una vez preparadas las muestras, los distintos reactivos y las soluciones de la recta patrón se procedió a llevar todo a una placa de 96 pocillos. Las primeras dos columnas de pocillos de la placa se emplearon para los estándares de la recta patrón.

Transferir 20 µl de estándar (por triplicado) o muestras (por duplicado) y añadir 60µl Reactivo A, 100µl Reactivo B, 100µl Reactivo C. Las muestras se descongelan, 800µl de muestra en 200µl of 50% TCA (para fijar las muestras) en tubos de 2ml, se centrifugan a 4000g por 20min a 4°C, se transfiere a un nuevo tubo. Luego hay que diluir las muestras en H₂Od., la dilución depende de la muestra; in-vivo necesita más dilución que in-vitro. Se puede empezar probando una dilución 1:5 (20 µl muestra + 80 µl dH₂O).

Seguidamente, se mezclan bien los tubos con la dilución antes de añadir a la placa e incubar en oscuridad a 39 °C durante 15 min.

Transcurridos esos 30 minutos la placa se volvió a meter en el lector de placas, en este caso, para medir la absorbancia en cada pocillo a una longitud de onda de 630nm. Una vez obtenidos los valores de absorbancia se pudo calcular la concentración de amonio presente en cada muestra gracias a la recta patrón.

3.3.3 Producción de gas y CH₄

La presión de gas resultante de la fermentación ruminal se midió con un manómetro digital (Wide Range Pressure Meter, Sper Scientific LTD, Scottsdale, AZ, USA) acoplado a una aguja (**Figura 15**), el cual se conectó con una aguja que se introdujo por el tapón de las botellas Wheaton. Las medidas de presión se transformaron a volumen siguiendo la ley de los gases ideales. Los datos de volumen se utilizaron para calcular la

cinética de producción de gas (Belanche *et al.*, 2016) ajustándolos a una ecuación predictiva descrita por France *et al.* (2000):

$$Y = A(1 - e^{-ct})$$

Y (mL) es la producción acumulada de gas en el tiempo t (h). A es la producción de gas potencial (mL) y c es la velocidad de producción de gas ($\mu\text{L/h}$)

La producción de CH_4 se midió con las muestras de gas tomadas tras 24 horas de incubación y almacenadas en tubos *vacutainer*. Posteriormente, 500 μL de estas muestras fueron introducidos en el cromatógrafo de gases junto con un patrón con concentraciones conocidas de metano. Los picos obtenidos con el cromatógrafo se compararon con los del patrón de forma que se pudieron calcular las concentraciones de CH_4 en cada muestra.

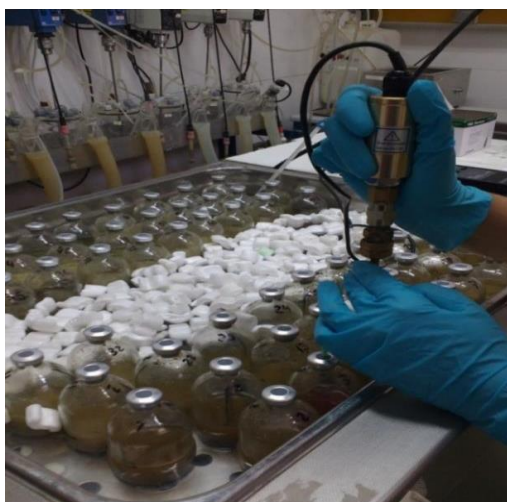


Ilustración 16: Momento de medida de presión de las botellas incubadas utilizando una aguja acoplada a un manómetro

3.4 Sacrificio y histología del rumen

Se pesó los animales una vez sacrificados, luego se pesó el tracto gastro intestinal total, y el rumen lleno, el rumen vacío, el omaso lleno, el abomaso lleno, el intestino total (delgado y grueso), una muestra del contenido del colon (para biología molecular) y se midió su pH. Luego se recogieron las siguientes muestras: tres muestras de rumen 1 ventral y otra dorsal para realizar estudio de histología y una tercera para extracción del ADN.



Ilustración 17: Imágenes de rumen lleno, rumen vacío, peso omaso y abomaso respectivamente

- Histología del rumen

El día de sacrificio se recogieron fragmentos de la pared ruminal tanto de la parte ventral como la dorsal, y se conservaron en formol a 4%. El día de análisis del desarrollo ruminal, se cortó un trozo muy fino de cada muestra con un bisturí y se puso en el estereomicroscopio LEICA M165FC conectado a un ordenador. Se realizaron fotografías de cada muestra y luego, con la aplicación imagej se determinaron, por triplicado, la longitud y la anchura de los pápiles ruminales y el grosor de la mucosa según la escala de referencia puesta anteriormente (1mm).

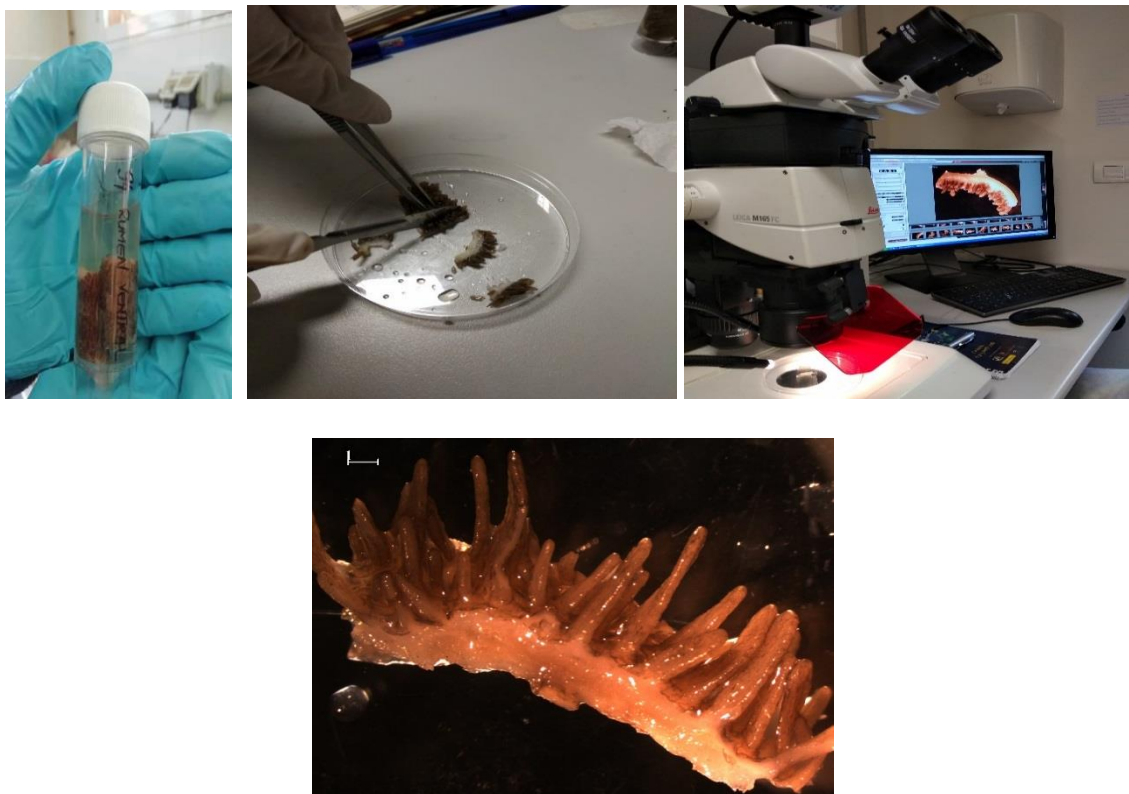


Ilustración 18: Histología del rumen

3.5 Cuantificación microbiana

3.5.1. Extracción de ADN

Para extraer el ADN genómico de las muestras del rumen en los ensayos in vivo, las muestras de contenido ruminal fueron congeladas a -80°C y posteriormente liofilizadas (flacón de 50 ml llevando liquido ruminal se liofiliza para que se concentra más ADN) como paso previo a la propia extracción. Tras descongelarse, las muestras fueron homogenizadas con 200 mg de microesferas (beads) en un homogenizador (Minibead Beater; BioSpec Products, OK, EEUU). A continuación, se utilizó el protocolo Kit QIAamp DNA Stoll Mini Kit (QIAGEN) para extraer el ADN de las muestras homogenizadas (Figura 19).

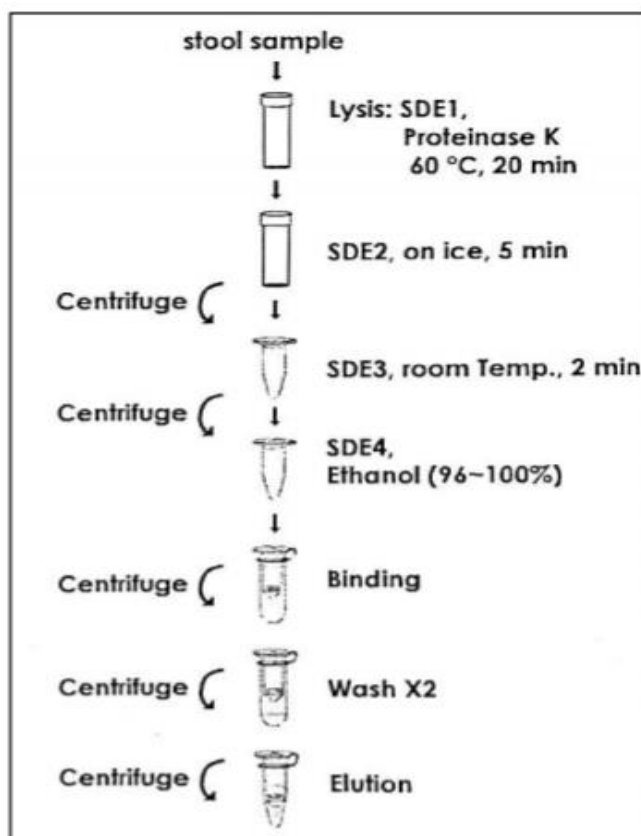


Ilustración 19: Esquema del protocolo de extracción de ADN FavorPrep TM Stool Isolation Mini Kit (FAVORGEN Biotech Corp.)

Se tomaron 50 mg de muestra del líquido ruminal anteriormente liofilizada e introducida en tubo eppendorf de 2 ml con bolitas de cristal. Luego se mantiene la muestra en hielo.

Se añade 1.4 ml de Buffer ASL a cada una de las muestras, poniéndolas en bead-beater durante 30 segundos y a velocidad media. Luego se vortexea de manera continua durante 1 min o hasta que la muestra se pone homogénea.

Llegando a este paso se dejan las muestras a temperatura ambiente (de 15-25°C). Tras ello se incubó a 95°C durante 10 min. Se agita en vortex durante 15 s y acto seguido centrifugamos 1 min a máxima velocidad y se pipeta 1.2 ml del sobrenadante y transferirlo a un nuevo eppendorf de 2 ml. Luego se añade una tableta de InhibitEX a cada muestra y se agita inmediatamente de forma continua durante 1 min o hasta que la tableta esté totalmente suspendida.

Luego se incuba la suspensión durante 1 min a temperatura ambiente para que la tableta absorbe los inhibidores presentes en la muestra. A continuación, se centrifuga la muestra durante 5 min a velocidad máxima. Y de nuevo se pipeta 400 µl del sobrenadante a un nuevo eppendorf de 1.5 ml y desechar el sobrante y centrifugamos 3 min a velocidad máxima. Se añade 15 µl de proteinasa K en un nuevo eppendorf de 1.5 ml. Acto seguido, se pipeta 200 µl del sobrenadante donde hay 400 µl y lo depositamos en el mismo eppendorf que contiene la proreinasas K. Se añade 200 µl de Buffer AL y se vortexea durante 15 s, y se incuba a 70°C durante 10 min. Se añade 200 µl de etanol absoluto al lisado y se vortexea.

A continuación, se rotulan las tapas de las columnas QIAamp spin e insertarlas en los tubos de colección de 2 ml. Y se aplica el lisado procedente del paso 14 con cuidado de colmarlas. Cerramos la tapa y centrifugamos a máxima velocidad durante 1 min.

Luego, se cambian las columnas a un nuevo tubo de colección de 2 ml y desechamos el tubo anterior que contiene el filtrado.

Posteriormente, se añaden 500 µl de Buffer AW1 a la columna QIAamp spin y. Cerramos la tapa y centrifugamos a velocidad máxima durante 1 min. Se cambia la columna a un nuevo tubo de colección y desechamos el tubo anterior con el filtrado.

Y volver a abrir cuidadosamente la columna QIAamp spin y añadimos 500 µl de Buffer AW1, cerramos la tapa y centrifugamos durante 3 min a velocidad máxima. Desechamos el tubo de colección que contiene el filtrado. Al final, se transfiere la columna QIAamp spin a un nuevo eppendorf de 1.5 ml, previamente rotulado. Se abre cuidadosamente la columna y pipeteamos 200 µl de Buffer AE directamente sobre la membrana de ésta. se cierra la tapa y se incuba durante 1 min a temperatura ambiente, acto seguido, se centrifuga a velocidad máxima durante 1 min para eluir el ADN.

3.5.2. PCR a tiempo real qPCR

El ADN purificado de las muestras de rumen se utilizó para cuantificar el número de copias del gen del ARNr 16S para bacterias, ARNr 18S para protozoos y hongos y *mcrA* (gen de la metil coenzima M reductasa A) para arqueas metanogénicas. La cuantificación se llevó a cabo mediante qPCR (PCR cuantitativa), utilizando un equipo Bio-Rad iCycler iQ Multicolor Real-Time PCR. Para obtener datos de abundancia absoluta, se realizó una curva patrón a partir de diluciones seriadas 1:10 de fragmentos de ADN específicos cuyo número de copias era conocido y generados mediante la utilización de plásmidos (Abecia et al., 2013). Los distintos elementos utilizados para dar lugar a la mezcla con la que se llevó a cabo la amplificación de cada muestra por qPCR fueron: -ADN purificado de la muestra: 2 µl. -Cebadores específicos para cada microorganismo, se recoge 0,2 µl de cebador de un sentido (F) y 0,2 µl de cebador del otro sentido (R). 33 -Supermix iQ SYBR® Green al 1x, que contiene: KCl 100 mM; Tris-HCl 40 mM pH 8,4; 0,4 mM de cada dNTP; MgCl₂ 6mM; fluoresceína 20nM; SYBR Green I (fluorocromo); estabilizadores y 0,05 U/µl de iTaq ADN polimerasa. - Agua milliQ: 10,1 µl.

En la qPCR, como en la PCR convencional, se llevan a cabo 3 etapas principales que, juntas, constituyen un ciclo. La 1ª etapa es la de desnaturalización del ADN, donde la temperatura es más elevada, en la 2ª se produce el anillamiento de cebadores al ADN y en la 3ª se produce la elongación, con posterior detección de fluorescencia. Las distintas etapas de la qPCR, su duración y su temperatura.

Desnaturalización inicial 95°C 5 minutos 1 ciclo, Desnaturalización 95°C 15 segundos 40 ciclos, Anillamiento de cebadores 60°C 30 segundos. Elongación de cebadores 72°C 55 segundos, detección de fluorescencia 75°C 6 segundos. Desnaturalización de ADN previa a la curva de disociación 95°C, 1 minuto y 75°C 1 minuto 1 ciclo Construcción de la curva de disociación 55°C 10 segundos 1 ciclo. Una vez terminada la qPCR se determinó el ciclo umbral (Ct) de cada muestra, que es el ciclo a partir del cual se detecta la fluorescencia emitida por el SYBR Green. Así se pudo obtener el número de copias total en función de la cantidad inicial del patrón (SQ) y su factor de dilución. La abundancia absoluta se obtuvo calculando el Log del número de copias del gen por unidad de muestra inicial.

3.6 Descripción del análisis estadístico

Todos los datos obtenidos fueron procesados con análisis multivariante de la varianza (ANOVA) en el software IBM SPSS Statistics 24.0 (Armonk, NY: IBM Corp.). En todos ellos se ha fijado el factor tratamiento (grupo Control vs. grupo con Adultos) como efecto principal. Y durante la segunda fase durante la digestibilidad, se ha añadido el factor reto como efecto fijo, así como su interacción

Concretamente, se han realizado cinco análisis independientes:

- 1) Datos recogidos durante el destete.
- 2) Datos recogidos durante los retos alimenticios, incluyendo el factor reto como efecto principal.
- 3) Datos recogidos tras los sacrificios.
- 4) Tasas de crecimiento en distintas edades.
- 5) Peso de los animales teniendo en cuenta el peso al nacimiento como covariable.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efectos a corto plazo: 5, 7 y 9 semanas de edad

Durante las primeras semanas de vida el estudio del efecto de la presencia o ausencia de adultos con los cabritos se llevó a cabo mediante la recogida y análisis de muestras del líquido ruminal a 3 edades diferentes: un muestreo en el pre-destete en la semana 5 (S5), una muestra al destete en la semana 7 (S7) y una muestra al post-destete en la semana 9 (S9) de vida de los animales.

En estas fases del trabajo (pre- y post-destete) los resultados mostraron escasas diferencias en la fermentación ruminal de los cabritos con o sin compañía de animales adultos (Tabla 4). Las características del rumen de estos animales a las 5 semanas de vida eran similares en cuanto a pH, concentraciones de $\text{NH}_3\text{-N}$ y de AGV, sin embargo los animales con acompañantes presentaron mayores niveles de ácido isobutírico (+32%, $=P=0,045$) así como una tendencia a presentar mayor proporción molar de butirato (+25%), $P=0,10$ y menor de acetato (-3%), $P=0,059$). Estos resultados indican algunas diferencias en el patrón de fermentación ruminal, posiblemente debido a la presencia de protozoos ruminales en el grupo ADL dado que estos microorganismos producen butirato como principal producto de fermentación (Newbold *et al.*, 2015).

A las 7 semanas de edad (momento del destete) se observó una mayor actividad fermentativa ruminal, indicativo de un mayor desarrollo fisiológico y microbiológico del rumen con respecto a dos semanas antes (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2015). Dicho desarrollo se manifestó con un descenso en la concentración de amonio y un incremento en la concentración de AGV totales (principalmente ácido butírico) que son claros ejemplos de una mayor captura de amonio por parte de la microbiota y una mayor acumulación de productos de fermentación microbiana (Morgavi *et al.*, 2014). Además, las diferencias observadas dos semanas antes entre los grupos ADL y CTL se incrementaron a las 7 semanas ocasionando un incremento significativo de la concentración molar de ácido butírico en el grupo ADL (+23%, $P=0,035$) en detrimento de ácido acético que fue tendió a ser menor (-3.4%, $P=0,06$) que en el grupo control.

Tabla 7: Patrón de fermentación del rumen de los cabritos de los grupos CTR (aislados de otros animales) y ADL (en compañía de animales adultos) a corto plazo (5, 7 y 9 semanas respectivamente)

	S5				S7				S9			
	CTL	ADL	EE	Valor P	CTL	ADL	EE	Valor P	CTL	ADL	EE	Valor P
pH	6,53	6,65	0,04	0,17	6,42	6,55	0,05	0,21	7,00	7,08	0,05	0,46
NH ₃ -N (mg/100mL)	17,62	18,62	1,22	0,69	15,27	14,1	1,23	0,64	2,82	8,16	1,37	0,05
AGV Totales (mM)	25,02	23,92	1,60	0,79	31,83	32,42	2,19	0,9	30,83	36,35	1,85	0,12
Acético %	74,74	72,47	0,61	0,06	71,39	69,02	0,63	0,06	66,98	63,58	1,56	0,89
Propiónico %	13,46	13,67	0,32	0,76	16,05	16,56	0,47	0,6	20,18	17,06	0,79	0,22
Isobutírico %	2,04	2,69	0,16	0,05	1,50	1,59	0,09	0,64	1,93	2,38	0,211	0,84
Butírico %	4,83	6,06	0,38	0,1	7,04	8,68	0,39	0,05	6,62	11,55	0,55	<0,001
Isovalérico %	2,61	2,91	0,15	0,33	1,92	2,12	0,13	0,44	2,23	3,40	0,21	0,003
Valérico %	2,29	2,22	0,07	0,67	2,09	2,02	0,08	0,71	2,04	2,02	0,11	0,67
Ac/Prop	5,69	5,39	0,16	0,35	4,61	4,27	0,15	0,25	3,48	3,82	0,26	0,82
Ramificados	4,64	5,59	0,31	0,12	3,36	3,68	0,21	0,45	4,50	5,78	0,36	0,07

EE: Error estándar de la media; ***P<0,001; **P<0,01; * P<0,05; t:0,05<P<0,1; ns no significativo.

En el periodo post-destete (9 semanas de edad) los animales pasaron de una dieta principalmente líquida a base de lacto-reemplazante a una dieta completamente sólida, lo que ocasionó importantes cambios en la función ruminal con respecto a la fase de lactante (pre-rumiante). Entre estos cambios se observó un descenso importante en la concentración ruminal de amonio, así como un incremento de pH ruminal.

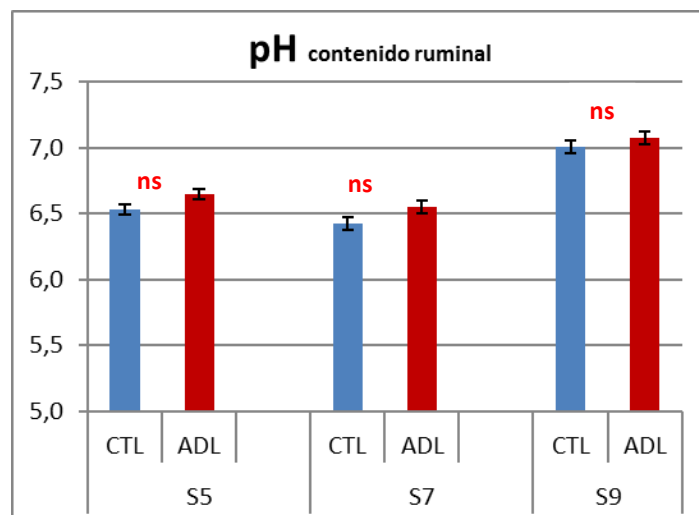


Ilustración 20: pH del contenido ruminal

***P<0,001; **P<0,01; * P<0,05; t:0,05<P<0,1; ns no significativo.

Error Estandar en S1= 0,04; en S2=0,05; en S3= 0,05

Las diferencias entre grupos experimentales incluso aumentaron respecto a las observadas en fases anteriores. Aunque la concentración de **amonio** no mostró diferencias durante los dos primeros muestreos, algo que es esperable en esta temprana edad, ya que la fermentación ruminal no está del todo desarrollada (Heinrihs, 2005) y los posibles efectos de la presencia de adultos aún no han podido revelarse. Sin embargo, al post destete (S9), la producción de amonio era significativamente mayor en el grupo ADL ($P=0,049$; +189%) con respecto al CTL (figura 21). Estas concentraciones se pueden deber a varios factores: una mayor eficiencia microbiana en el uso del nitrógeno en CTL debido a una menor degradación proteica o una mejor absorción a partir de la pared ruminal (Dijkstra et al., 2002). Esto se podría explicar por la mayor concentración de protozoos en animales del grupo ADL, sabiendo que la mayoría de los protozoos ruminales y en especial los Entodiniomorfos son depredadores de bacterias ya que estas últimas representan su principal fuente de proteína (Belanche et al., 2012). Como consecuencia de ello, la completa eliminación de los protozoos del rumen (defaunación) se ha mostrado que posee efectos positivos sobre la eficiencia de utilización de la proteína dietética, así como sobre las emisiones de metano, si bien la digestión de la fibra puede verse ligeramente comprometida (Newbold et al., 2015).

En cuanto a la producción de los ácidos grasos volátiles ramificados, aunque la diferencia no fue significativa entre los 2 grupos, el grupo ADL tuvo tendencia a producir más ácido isobutírico e isovalérico junto con el amoníaco (ilustración 21).

Yang et al., (2002) demostraron que estos productos de fermentación pueden ser utilizados como indicadores rápidos de la degradación de proteínas en el rumen. Las diferencias en este patrón de degradación proteica puede explicarse por la presencia de protozoos en el grupo ADL lo que fomentaría la acumulación de dichos productos de fermentación (ácidos grasos ramificados y amonio) (Belanche *et al.*, 2012, Newbold *et al.*, 2015).

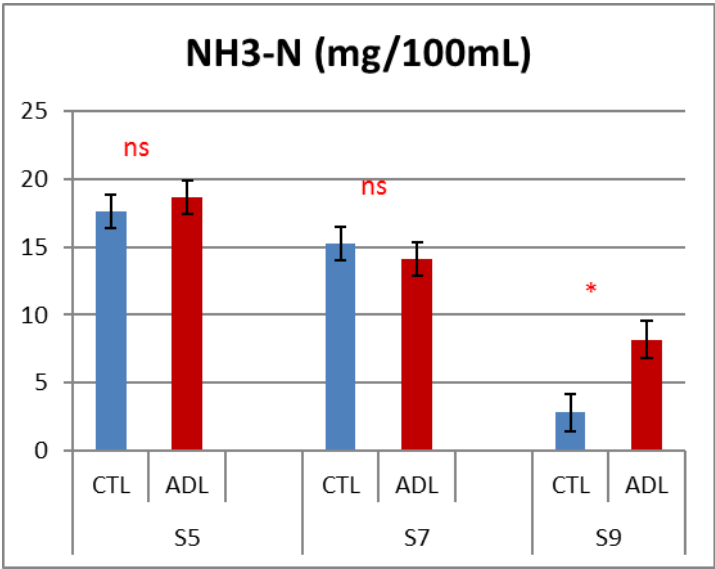


Ilustración21: Producción de amonio en el rumen

***P<0,001; **P<0,01; * P<0,05; t:0,05<P<0,1; ns no significativo.

Error Estandar en S1= 1,22 ; en S2=1,23; en S3= 1,37

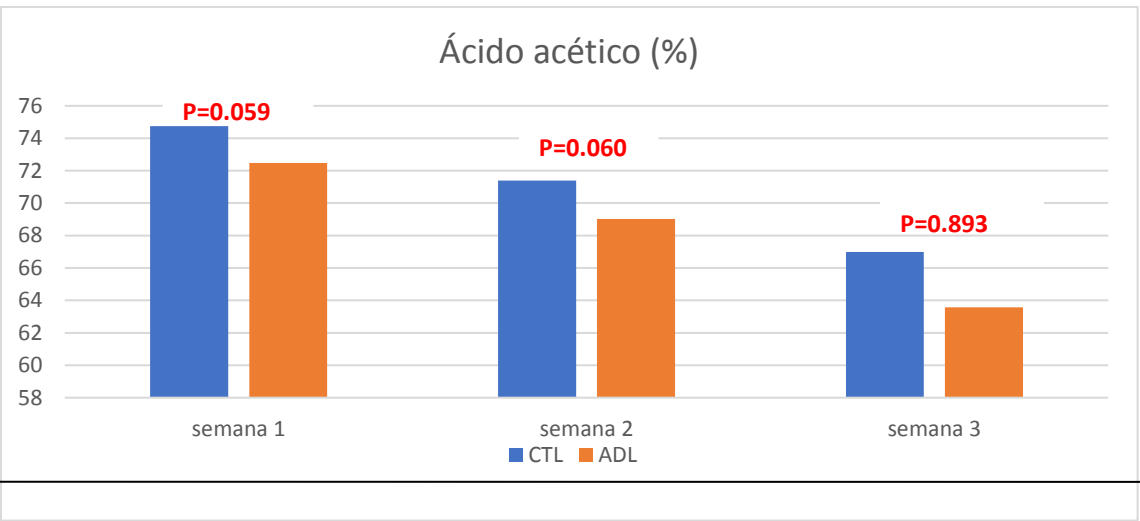


Ilustración 22: porcentaje de ácido acético en cada grupo por S5, S7 y S9

Error Estandar en S1= 0,61; en S2=0,63; en S3= 1,56

La producción de ácido acético tendió a ser superior en el grupo CTL que en el ADL durante la lactancia, pero las diferencias se redujeron durante la fase post-destete (ilustración 22). Por el contrario, el ácido graso volátil con diferencias más reseñables entre los grupos experimentales es el butírico, el cual fue siempre superior en ADL: su concentración fue 6,06% a S5, ($P= 0,104$), 8,68% a S7 ($P= 0.035$) y 11,55% a S9 en ADL ($P=0$) (ilustración 23).

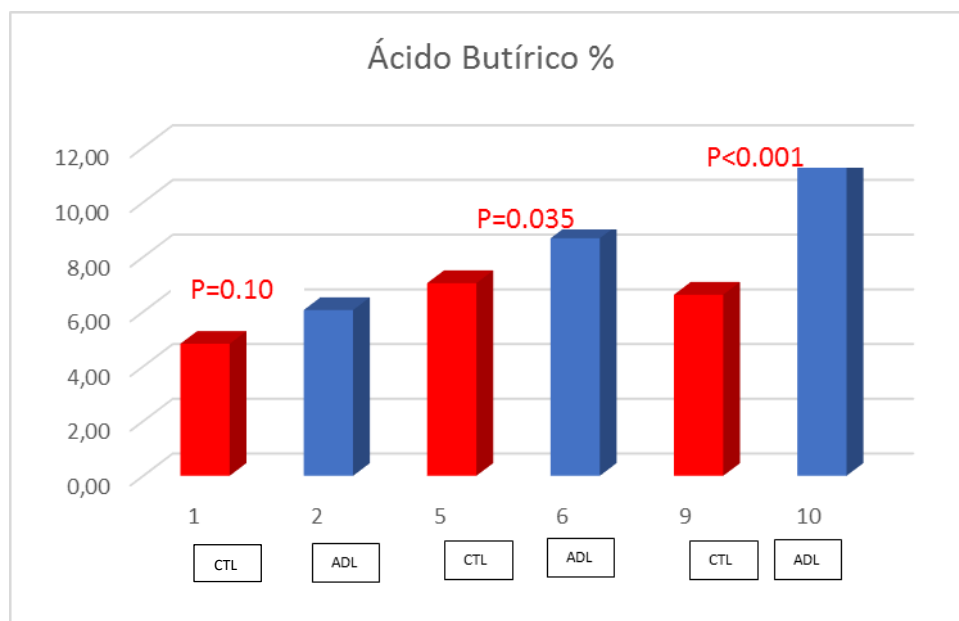


Ilustración 23: Porcentaje del ácido butírico en el rumen

Error Estandar en S1= 0,38; en S2=0,392; en S3= 0,553

Como hipótesis preliminar, con una producción de ácido acético más baja y la de butírico y propiónico mayor, se podría decir que los animales del grupo ADL eran más eficientes. Estas ventajas podrían ser explicadas debido a que la mayoría del butirato se convierte en la pared del rumen a una cetona que se llama beta-hidroxibutirato que pasa al hígado y que es una de las principales fuentes de energía para el rumiante. El ácido propiónico es el único que interviene en gluconeogénesis y por último, el acetato también participa en el metabolismo energético del animal, pero si su producción a nivel ruminal es muy elevada, el aprovechamiento energético por parte del animal es menos eficiente (Cook et al., 1965).

Además, los animales del grupo ADL produjeron más ácido isobutírico ($P= 0,045$). Esta diferencia significativa no se ve al pre-destete pero luego la tendencia de esta

superioridad persiste hasta el final con un incremento del 54% al post-destete, posiblemente como consecuencia de la mayor proteólisis esperada en el grupo ADL como fruto de una mayor diversidad microbiana y una mayor presencia de protozoos ruminales (Belanche *et al.*, 2011, Belanche *et al.*, 2012). Estos resultados están en consonancia con publicaciones previas (Abecia *et al.*, 2014) que demostraron que el contacto directo con animales adultos desde el nacimiento puede acelerar el desarrollo ruminal, de tal modo que cabritos que recibieron lactancia natural presentaron una mayor concentración de AGV a partir de los 3 días de vida con respecto a cabritos con lactancia artificial y en ausencia de contacto con adultos. De forma similar, también se ha demostrado que la utilización de levadura como probiótico en cabritos recién nacidos dio como resultado un incremento en la concentración de AGV, bacterias totales y ganancia media diaria de peso. Por lo tanto, parece evidente que la exposición a un inóculo microbiano a edades tempranas (ya sea presencia de la madre, levaduras o presencia de adultos) puede proporcionar ventajas sobre el desarrollo microbiológico del pre-rumiante, así como una aceleración de su comportamiento alimentario en lo referido a la ingestión de alimento sólido (De Paula Vieira *et al.*, 2012, Abecia *et al.*, 2017).

Aparte de los análisis de fermentación ruminal, se llevó acabo un recuento microscópico de protozoos de muestras del líquido ruminal recogidas a las 5, 7 y 9 semanas de edad y se observó que el líquido ruminal del grupo CTL no contenía protozoos en ninguna de las etapas estudiadas. Esto puede explicar el hecho que el grupo ADL contiene mayores concentraciones de ácido butírico y amonio. Este resultado concuerda con resultados de Yáñez-Ruiz *et al.* (2007) donde se observó ausencia en animales aislados de animales adultos desde el nacimiento, así como con los efectos descritos en la fermentación ruminal en animales defaunados (Newbold *et al.*, 2015).

4.2 Efectos a largo plazo (a partir de 9 meses de edad)

Como hemos descrito anteriormente, la presencia de animales adultos como acompañantes moduló en cierta medida la fermentación microbiana ruminal. Varios autores han realizado ensayos similares describiendo los efectos a corto plazo de intervenciones nutricionales a edades tempranas (Abecia *et al.*, 2013, O'Hara *et al.*, 2018), sin embargo existen muy pocos estudios que describan la persistencia de los

efectos a largo plazo y sus implicaciones productivas (Dill-McFarland *et al.*, 2019). Por ello, en nuestro ensayo se estudió el efecto a largo plazo de la presencia de animales acompañantes adultos en edades tempranas. Es sabido que la presencia de una microbiota ruminal más diversa puede ser beneficiosa o perjudicial dependiendo de la dieta recibida por el animal rumiante, siendo más beneficiosa la alta diversidad microbiana en animales sometidos a dietas fundamentalmente a base de forraje (Weimer, 2015, Belanche *et al.*, 2019), mientras que los animales con baja diversidad microbiana suelen ser los más eficientes cuando son alimentados con dietas ricas en alimentos concentrados (Shabat *et al.*, 2016).

Por todo ello, en esta segunda fase, cuando los animales alcanzaron los 9 meses de edad, se analizó el efecto del tratamiento (la presencia o ausencia de animales adultos con los cabritos cuando eran pequeños) bajo dos tipos de dieta (dieta Forraje (F) o Concentrado (CC)) sobre la fermentación ruminal, la población microbiana del rumen y la digestibilidad de la dieta.

Tabla 8: Efecto a largo plazo (9 meses de edad) presencia de animales adultos y del tipo de dieta sobre la ingestión y fermentación ruminal in vivo y la producción de gas y producción de metano in vitro

	Dieta CC		Dieta F		EE	Valor P		
	CTL	ADL	CTL	ADL		TRT	Dieta	TRTxD
Amonio (mg/100mL)	29,06	30,28	7,34	6,46	2,028	0,91	<0,001	0,51
pH	6,49	6,37	7,22	7,26	0,092	0,62	<0,001	0,28
AGV totales (mM)	57,78	54,24	36,50	38,27	6,357	0,86	0,001	0,60
Acético%	60,36	62,34	70,18	69,54	0,952	0,41	<0,001	0,12
Propiónico%	21,32	18,97	17,63	17,69	1,428	0,29	0,03	0,27
Isobutírico%	1,46	1,31	2,1	1,92	0,265	0,45	0,006	0,94
Butírico%	12,17	13,76	7,17	8,28	0,897	0,06	<0,001	0,73
Isovalérico%	2,84	1,92	1,92	1,73	0,433	0,09	0,095	0,26
Valérico%	1,89	1,69	0,98	0,83	0,101	0,05	<0,001	0,74
Ramificados%	4,3	3,23	4,02	3,66	0,68	0,18	0,89	0,50
Acético/Propiónico	2,89	3,54	4,01	3,96	0,27	0,17	0,001	0,11
Ingesta Forraje g/día	69,89	94,56	677,70	668,17	10,58	0,67	<0,001	0,35
Ingesta Concentrado g/día	818,06	697,04	<0,001	<0,001	71,05	0,24	<0,001	0,24
Incubación <i>in vitro</i>								
Metano 8h (% de gas)	6.37	3.7	1.7	1.3	0,004	0	<0,001	0,001
Metano a 24h ml (% de gas)	6.28	5.1	2.5	2.1	0,004	5,0	<0,001	0,14
Producción Gas en 24h (ml)	143,56	108,9	45,60	36,35	13,58	0,03	<0,001	0,2
CH ₄ Total en 24h (mL)	9,48	5,77	1,16	0,77		0,02	<0,001	0,05
CH ₄ /AGV Totales (mL/mM)	0,16	0,11	0,04	0,02		0,02	<0,001	0,14

Efecto a largo plazo del tratamiento (animales acompañantes)

La presencia de animales acompañantes adultos durante edades tempranas originó un escaso efecto sobre los parámetros de fermentación ruminal a los 9 meses de edad. Como consecuencia, no se encontraron diferencias en la ingestión de alimento, así como en el pH ruminal, AGV totales o la concentración molar de ácido acético y propiónico. Sin embargo, en los animales del grupo ADL persistió la mayor concentración de ácido butírico en rumen tanto en la dieta concentrada (+13%) como bajo la dieta forrajera (+16%). Puesto que la concentración de protozoos ruminales, determinada por qPCR a los 9 meses, no varió entre tratamientos, esta diferencia podría deberse a una mayor biodiversidad en protozoos por el grupo ADL, ya que existen diferencias en el tipo de fermentación entre algunas especies de protozoos en el rumen (Belanche et al., 2015). Esta mayor producción de butirato podría representar una ventaja desde el punto de vista energético dado su mayor eficiencia de síntesis en comparación con el acetato.

Además, los animales CTL presentaron una mayor proporción molar de valerato ($P=0,05$) e iso-valerato ($P=0,095$) en comparación con el grupo ADL. El iso-butirato, así como metil-butirato y el iso-valerato, son sintetizados por los microorganismos ruminales vía desaminación oxidativa y descarboxilación oxidativa de los aminoácidos ramificados valina, isoleucina y leucina, respectivamente (Andries *et al.*, 1987). Por su parte el valerato procede de carbohidratos pero también de la degradación de los aminoácidos prolina, arginina, lisina y metionina (Andries *et al.*, 1987). Las bacterias celulolíticas son las que principalmente participan en este proceso, pero también se ha descrito la participación de bacterias no-celulíticas (Amos *et al.*, 1971). Por lo tanto las diferencias en la concentración de iso-acidos entre los grupos ADL y CTR podrían indicar la persistencia de diferencias entre los principales grupos microbianos en el rumen de animales de 9 meses de edad.

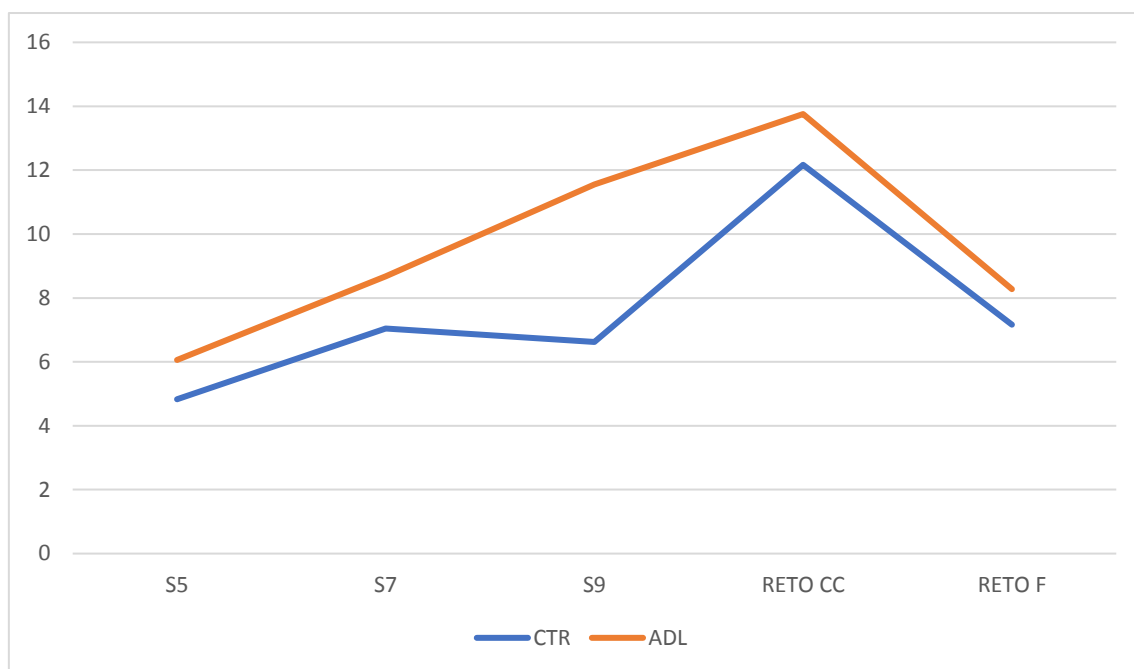


Ilustración24: Evolución de la proporción molar del ácido butírico en el rumen durante el experimento

En lo que concierne a la incubación in vitro realizada con líquido ruminal recogido individualmente de cada animal, tanto la producción de gas total como de CH₄ fue mayor en los animales CTL, independientemente del tipo de dieta recibida. Estas diferencias son difíciles de explicar, ya que tanto la concentración de AGV totales como la de los distintos grupos microbianos es similar entre las dos dietas. Un aspecto reseñable fue la interacción observada entre el tratamiento y el tipo de dieta sobre la producción total de metano en 24h ($P=0,048$). En particular, se observó que los animales CTL alimentados presentaban mayores emisiones de metano que los del grupo ADL pero sólo cuando fueron alimentados con dieta rica en concentrado (9.48 vs 5.77 mL), mientras que dichas diferencias en emisiones de metano fueron mucho menores y no significativas cuando se alimentaron con dietas ricas en forraje (1.16 vs 0.77 mL). Además, dichas diferencias fueron especialmente marcadas durante la fermentación temprana (durante las primeras 8h de incubación) sugiriendo que durante este periodo de tiempo existe una mayor actividad microbiana en el grupo CTL que en el grupo ADL. Es comúnmente aceptado que las bacterias ruminales presentan una tasa metabólica y un ritmo de degradación del alimento más rápido que los protozoos (Dehority, 1998). Por lo tanto nuestros resultados parecen indicar que en el grupo CTL existe una mayor actividad bacteriana durante la fermentación temprana, quizá la menor diversidad protozoaria en este grupo esté compensada por una mayor abundancia de

bacterias fibrolíticas (Belanche *et al.*, 2012). Por su parte en el grupo ADL es posible que la fermentación se realice de forma más pausada por la acción de protozoos ruminales (Dehority, 1973). A efectos de eficiencia energética, los animales ADL presentaron una menor producción de metano por unidad de AGV para ambos tipos de dietas. Aunque teóricamente esto podría interpretarse como una ventaja desde el punto de vista energético, no se encontraron diferencias productivas entre ambos grupos de animales ya que todos presentaron similares ganancias de peso la fase de crecimiento y cebo.

En lo referido a la concentración ruminal de los principales grupos microbianos (Tabla 8), la presencia de animales adultos acompañantes durante edades tempranas no ejerció efectos a largo plazo sobre la concentración ruminal de microorganismos eucariotas (hongos anaerobios y protozoos). Por el contrario, se encontró una persistencia de los efectos en la concentración ruminal de microorganismos procariotas (bacterias y arqueas). En particular, el grupo ADL presentó mayor nivel de bacterias ruminales que el grupo CTL, aunque las diferencias solamente tendieron a ser significativas cuando los animales fueron alimentados con dieta rica en concentrado (Interacción $P=0,088$). Similar incremento en la concentración de arqueas fue observado en el grupo ADL alimentado con concentrado en relación al grupo CTL (8.52 vs 7.62 log copias/g MF), sin embargo, en los animales alimentados por forraje ocurrió lo contrario (8.43 y 8.79 log copias/g MF para los grupos ADL y CTR, respectivamente). Como consecuencia, se observó una interacción significativa entre el tratamiento y el tipo de dieta para la concentración ruminal de arqueas ($P=0,001$). Aunque estos resultados son difíciles de interpretar, parecen apoyar la hipótesis que sugiere una falta de correlación entre las emisiones de metano y la concentración ruminal de arqueas metanógenas (Morgavi *et al.*, 2010). Quizá la expresión de los niveles de arqueas por unidad de materia seca o como porcentaje del número de bacterias totales podría facilitar la interpretación de estos resultados ya que es sabido que la defaunación y el tipo de dieta pueden afectar no sólo al ritmo de dilución ruminal (y por consiguiente al porcentaje de MS del mismo), así como a la abundancia relativa de microorganismo como las arqueas (Belanche *et al.*, 2012).

Efecto del tipo de dieta

Como se esperaba, existieron diferencias significativas entre las dos dietas en casi todos los parámetros. La producción de amonio fue más alta (de 4 a 5 veces) para la dieta CC que para F para el grupo CTL y ADL respectivamente. Sabiendo que la evolución del pH y amonio siguen un patrón opuesto, lo mismo es en nuestro caso, el pH del líquido ruminal más bajo correspondió a la dieta concentrada (inferior a 6,5). Resultados similares se obtuvieron en el estudio de Giráldez et al., (1994) en el que suministraron 2 dietas diferentes en dos periodos distintos con una duración de 3 semanas: heno de alfalfa en periodo 1 y heno de alfalfa más cebada en el periodo 2. Los valores de pH más bajos ($P < 0,05$) correspondieron a la dieta con cebada, siendo los valores medios $6,85 \pm 0,092$ para la dieta heno de alfalfa y $6,49 \pm 0,10$ para la dieta heno de alfalfa y cebada.

La evolución del pH y amonio en el rumen siguen un patrón opuesto. Las variaciones postprandiales en los valores de pH y de N-NH₃, en el líquido ruminal fueron similares a las observadas por otros autores (Argyle, Baldwin, 1988; Gasa et al., 1991). La bajada de pH es asociada al incremento de la producción de los AGV Totales. Cuando el pH pasa de 7,21 con el reto Forraje a 6,48 con el reto Concentrado del mismo grupo CTL, la producción de los AGV Totales pasa de 36,5 a 57,78. No obstante, cuando el pH baja mucho hasta 6,36, la producción de los AGV baja de 57,78 a 54,23. En este contexto, Sánchez et al. (2018), confirmaron que la producción total de AGV tendió a ser menor con el pH 6,4 que con el pH 6,8 y se observaron algunas diferencias significativas en el patrón de fermentación.

La bajada de pH cuando se pasa de la dieta forraje a concentrado está relacionada con la mayor producción de AGV y lactato. Este resultado coincide con lo publicado en la bibliografía (Bath et al., (1965) quien informaron que en general, el aumento en ácido propiónico se observa cuando la cantidad de concentrado adicionada es elevada y su composición es a base de granos con gran cantidad de almidón, y que el acetato es el principal producto final de degradación de los carbohidratos fibrosos. Así, la ratio acetato/propionato fue más alto para la dieta forraje. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sánchez et al., (2018) que confirmaron que la producción de acetato fue menor a un pH 6,4 que a un pH 6,8, pero, el pH no tuvo un efecto significativo sobre las producciones de propionato, butirato y L-lactato. La ratio acetato/propionato

fue menor ($P < 0,05$) al disminuir el pH en el medio de cultivo, pero sólo cuando se incubó el concentrado.

En lo referido a la concentración ruminal de los principales grupos microbianos. Aunque, la concentración de arqueas fue más baja en la dieta concentrado, la producción de CH₄ es más elevada también con esta dieta, y eso se podría explicar por la alta concentración de protozoos. Así, Yañez-Ruiz et al., (2008) llegaron a la conclusión que no hay una relación clara entre el número de metanógenos y metanogénesis en el rumen, aunque existe una correlación directa entre el número de protozoos y producción de metano. En el mismo contexto, Belanche et al., (2015) confirmaron que los protozoos Holotricos poseen una gran implicación en la producción de metano entérico.

Por otro lado, la concentración de butirato y la producción de CH₄ in vitro fue más elevada con la dieta concentrada (ilustración 23). En este contexto Moss et al., (2000) señalan que el acetato y el butirato promueven la producción de metano, mientras que la formación de propionato puede ser considerada como una forma competitiva en el uso del H₂ en el rumen. También añadieron que el acetato es preponderante bajo dichas condiciones, pero no se considera precursor significativo de metano en el rumen.

Tabla 9: Concentraciones de microorganismos (bacterias, arqueas, protozoos) en líquido ruminal de los grupos alimentados con las dos dietas experimentales

	Dieta CC		Dieta F		EE	Valor P		
	CTL	ADL	CTL	ADL		Tratamiento	Reto	TxR
Bacterias log copias /g MF	11,12	11,62	10,85	10,85	0,18	0,09	0,001	0,09
Arqueas log copias/g MF	7,62	8,52	8,79	8,43	0,18	0,14	0,005	0,001
Hongos log copias/g MF	6,73	6,77	7,72	7,50	0,3	0,71	0,001	0,58
Protozoos log copias/g MF	9,16	9,59	9,10	9,10	0,3	0,35	0,224	0,35

Por último, la concentración de bacterias fue más elevada para la dieta concentrado ($P=0.01$). Por el contrario, la de hongos y de arqueas fue mayor para la de forraje con probabilidades $P=0.01$ y $P=0.05$. Y la concentración en protozoos no muestra una diferencia significativa entre los 2 grupos, aunque el grupo ADL presentó un valor numérico más elevado que el CTL cuando los animales fueron alimentados con una dieta rica en concentrado. Eso lo que confirma Henderson et al., (2015), diciendo que las bacterias son el grupo de microorganismos ruminales que responden de manera más clara a los cambios en la composición de la dieta en comparación con protozoos, arqueas y hongos ruminales.

En tema de hongos, Yáñez-Ruiz y Belanche (2017) informaron que los sistemas intensivos en comparación con los basados en pastoreo, dónde la alimentación es basada en alimento concentrado, la capacidad de degradar material lignocelulósico viene limitada por la baja presencia de microorganismos fibrolíticos (Belanche *et al.*, 2019). A este respecto, los hongos ruminales que son especialistas en la digestión de sustratos lignocelulósicos no son abundantes con dieta basada en concentrado.

Efecto a largo plazo sobre ingestión, digestibilidad y crecimientos

Tabla 10: La ingesta de forraje, concentrado y la digestibilidad

	Dieta CC		Dieta F		EE	Valor P		
	CTL	ADL	CTL	ADL		Tratamiento	Reto	TxR
IngestaForraje g/día	69,89	94,56	677,69	668,17	3,52	0,674	<0,001	0,35
IngestaConcentrado g/día	818,06	697,04	0	0	3,74	0,24	<0,001	0,24
Digestibilidad (%)	73,93	70,24	64,81	66,94	2,56	0,581	<0,001	0,046

En lo referido a ingestión de alimento y digestibilidad del mismo (Tabla 10), el grupo ADL ingirió más forraje mientras que el grupo CTL ingirió más concentrado, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas, por lo que cualquier interpretación sería muy especulativa.

Aunque trabajos recientes (De Paula Vieira et al., 2012), han llegado a concluir que el alojamiento de terneros jóvenes con un compañero mayor estimula el aprendizaje del comportamiento de ingesta de alimento sólido y el crecimiento antes y después el destete, sería difícil esperar que esta influencia permaneciese a los 9 meses en un ambiente controlado en estabulación con una oferta limitada de alimento (heno o concentrado).

En lo que concierne el consumo del alimento concentrado, nuestros resultados son diferentes a lo que demostraron De Paula Vieira et al., (2012), indicando que, durante el período posterior al destete, los terneros alojados con un compañero mayor consumieron más pienso en comparación con los terneros de edad similar sin acompañantes de mayor edad. Sin embargo, hay que tener en cuenta que su estudio solo abordó el post-destete (1 a 2 meses de edad), mientras que en nuestro experimento hablamos de animales que tienen 9 meses de edad, por lo que es esperable una dilución de los efectos con el paso del tiempo.

Del mismo modo, De Paula Vieira et al., (2012) añadieron que la ingesta de heno durante el período de pre-destete fue mayor para los terneros alojados con un compañero mayor y que estos terneros también presentaron mayor frecuencia y duración de las visitas al comedero de heno. Durante el período de destete, la ingesta de heno, el número de visitas y el tiempo que pasaron en el comedero de heno fueron similares para los 2 tratamientos. Durante el período de post-destete, la ingesta de heno y el número de visitas al alimentador del heno no difirieron entre los 2 tratamientos.

La digestibilidad de la dieta concentrada es más alta que la de forraje ($P=0.001$), debido al mayor contenido de carbohidratos fácilmente fermentables en la dieta de concentrado. Además, dentro de la dieta forraje, la digestibilidad del grupo ADL fue superior a la del grupo CTL (+3%) mientras que en la dieta rica en concentrado el grupo ADL presentó una menor digestibilidad de la dieta (+5%). Como consecuencia de ello se observó un efecto significativo de la interacción entre el tratamiento y la dieta para la digestibilidad del alimento ($P=0.046$). Estos resultados podrían indicar que los animales del grupo ADL están mejor preparados para digerir forraje por tener una composición de microorganismos más apta para ello o un rumen con mayor capacidad. Por el contrario, los animales del grupo CTL parecen preferir consumir más concentrado. Esta preferencia por el concentrado ya quedó manifiesta durante la etapa de lactancia en la

que se observó que el grupo CTL comenzó a comer forraje a edades más avanzadas que el grupo ADL. En este contexto, Pounden y Hibbs, (1948) informaron que la presencia de un compañero mayor también podría haber aumentado la disponibilidad de microorganismos en el ambiente, permitiendo una inoculación temprana de la microbiota en el tracto digestivo de los terneros jóvenes alojados con un compañero mayor. Las consecuencias de esta inoculación temprana sobre la digestibilidad del alimento y los parámetros productivos todavía precisan de estudios más detallados.

Tabla 11: Efecto del tratamiento y sexo sobre el peso vivo de los animales (Kg)

		Peso destete (Kg)	Peso 5 meses (Kg)	Peso final (Kg)
Tratamiento (TRT)	Control	7.96	18.43	27.34
	Adultos	8.06	18.30	25.24
SEXO	Hembra	7.96	17.14	25.38
	Macho	8.06	19.59	27.20
EEM		0,35	0,68	0,85
P TRT		0.89	0.93	0.29
P sexo		0.88	0.11	0.32
P TRT*SEXO		0.84	0.83	0.93

Para el estudio de los pesos y crecimientos se incluyó el factor sexo (machos vs hembras) puesto que está bien establecido que los machos presentan un mayor crecimiento durante la fase de crecimiento y alcanzan mayores pesos al sacrificio que las hembras de su misma edad. Sin embargo, en nuestro ensayo los resultados del análisis estadístico tratando el peso vivo muestran que ni el tratamiento, ni el sexo o la interacción tratamiento*sexo afecta el peso vivo en ninguna fase (ilustración 25).

Aunque el grupo ADL consumió más forraje y empezó a comerlo antes que el grupo CTL, no se observaron diferencias de peso entre los 2 grupos a la edad del destete, a los 5 meses y 9 meses (sacrificio). Nuestros resultados no concuerdan con los observados por De Paula Vieira et al., (2008) y por Passillé et al., (2011), que confirmaron que los terneros que consumen poco alimento sólido antes del destete tienen más probabilidades de experimentar un bajo crecimiento post-destete hasta que el consumo de alimento sólido satisfaga con sus requisitos de mantenimiento y crecimiento.

En el mismo contexto, De Paula Vieira et al (2012) añadieron que una mayor ganancia de peso se observa en terneros en edad temprana criados en presencia de animales de

mayor edad, sin embargo, estas diferencias se deberían, en gran medida, la influencia de los animales mayores en el comportamiento alimentario de los pequeños.

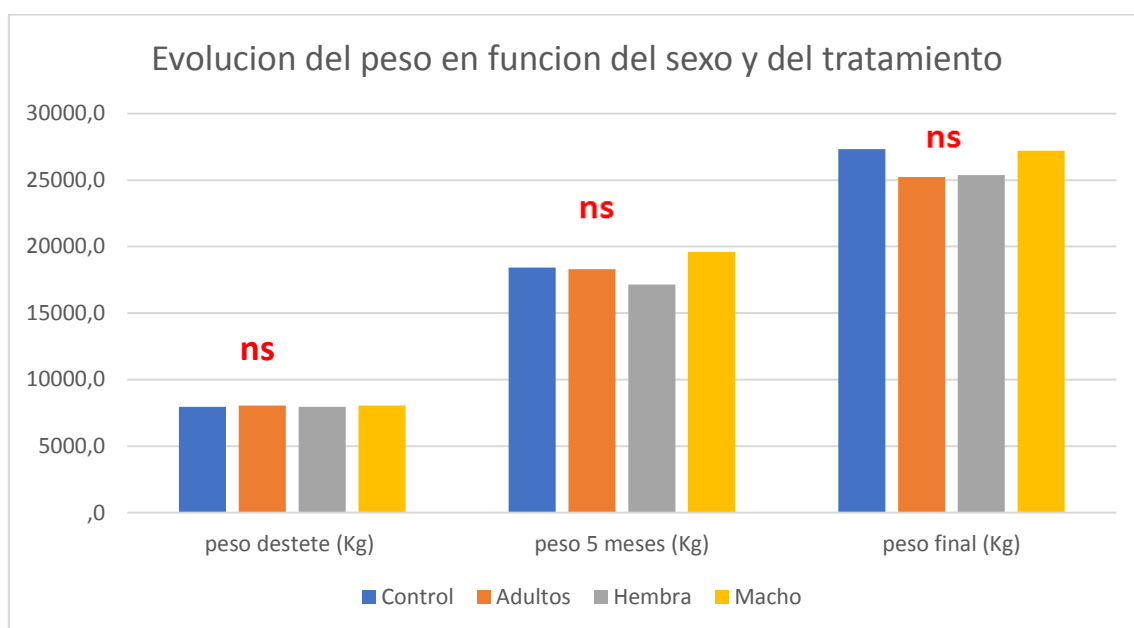


Ilustración25: Evolución del peso en función del sexo y del tratamiento

* es $p < 0.05$, ** es $p < 0.01$ y *** es $p < 0.001$ ns es no significativo

La separación de los adultos del grupo tratamiento se hizo a una edad de 4 meses (equivalente a 17 semanas). Esta separación tuvo un efecto claro (ilustración 23) con una baja repentina del peso vivo de este grupo. Esto puede ser explicado por la perturbación que ha supuesto para grupo, ya que los animales se habían acostumbrado a comer junto a los adultos y la separación de éstos últimos pudo ocasionar una situación estresante para el grupo ADL. Similares descensos en la ingestión y en los crecimientos se han descrito en corderos sometidos a un estrés social dado a que los animales deben reestablecer la jerarquía en el grupo (Miranda-de La Lama *et al.*, 2012). De hecho, a partir de ese evento de retirada de los acompañantes, el peso vivo medio del grupo ADL fue siempre inferior al del grupo CTL, a pesar de que las diferencias no fueron significativas. Como consecuencia de ello, los animales ADL mostraron una tendencia a presentar menores crecimientos ($P=0,1$) durante la última fase de cebo (de 5 a 9 semanas de edad) como puede verse en la tabla 12.

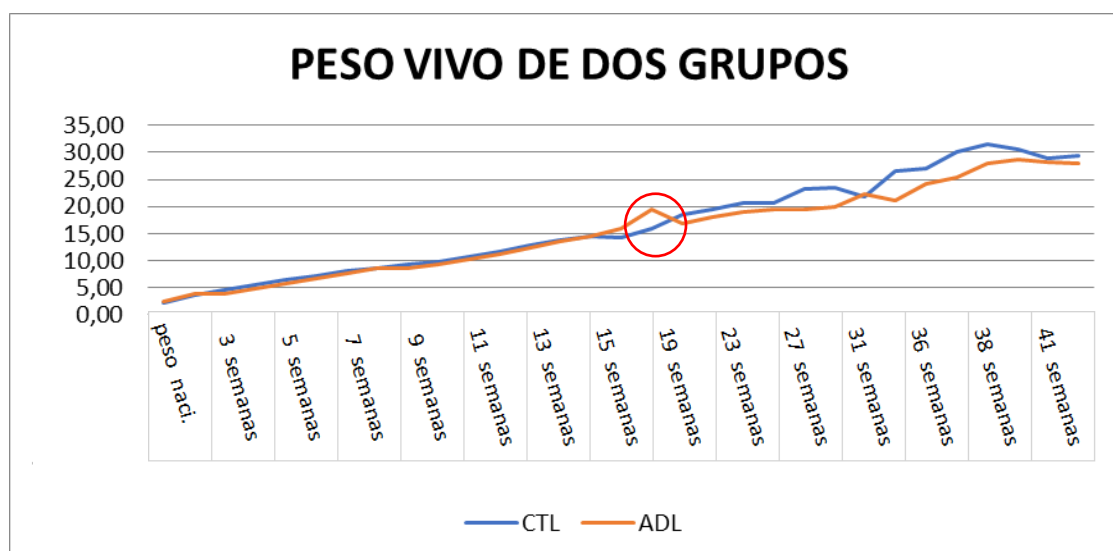


Ilustración 26: Evolución del peso vivo de los animales desde el nacimiento hasta el sacrificio

Tabla 12: Las tasas de crecimiento de los animales

		Tasa de crecimiento nacimiento al destete (Kg/día)	Tasa de crecimiento del destete a 5 meses (Kg/día)	Tasa de crecimiento final de 5 meses-sacrificio (Kg/día)
TRT	Control	0,11	0,92	0,05
	Adultos	0,12	0,91	0,04
SEXO	Hembra	0,12	0,08	0,05
	Macho	0,12	0,1	0,05
EEM		0,01	0,01	0,01
P TRT		0,60	0,73	0,14
P SEXO		0,99	0,02	0,43
P TRT*SEXO		0,92	0,58	0,73

Los resultados tratando la tasa de crecimiento durante tres intervalos del nacimiento a 5 meses (la mitad de la duración del experimento) y de 5 meses al sacrificio muestran que la presencia de adultos a edad temprana no afecta ni a corto, ni a medio plazo, pero tienden a ser inferior a largo plazo ($P=0,14$). Además, el sexo afecta la tasa de

crecimiento del destete a 5 meses en favor de los machos dado su mayor capacidad de depositar músculo en comparación con las hembras.

Histología del rumen y tracto gastro-intestinal

Tabla 13: Análisis de histología del epitelio del rumen

	CTL	ADL	Valor P
Saco dorsal rumen			
Longitud papila (mm)	3,07	3,27	0,428
Grosor papila (mm)	1,10	1,11	0,922
Grosor de la pared (mm)	2,20	2,29	0,646
Saco ventral rumen			
Longitud papila (mm)	2,30	3,05	0,877
Grosor papila (mm)	1,09	0,94	0,210
Grosor de la pared (mm)	2,47	2,97	0,027

El análisis histológico (grosor y longitud de las papilas y grosor de la pared ruminal) mostró valores superiores en el grupo ADL, aunque solo alcanzaron significancia estadística en el caso del grosor de la pared ruminal. La longitud de las papilas en el saco ventral del rumen fue mayor en el grupo control (1,085 mm), con una media de peso vivo más alta, aunque estas diferencias no fueron significativas. Estos resultados concuerdan con los expuestos por Bloomfield (1963), quien observó que la longitud de la papila del saco ventral del rumen está en correlación positiva con la ganancia de peso del animal.

En lo que concierne al grosor de la pared ruminal en el saco ventral, el grupo ADL presentó mayores valores que el grupo CTL. Según Alarcón et al., (2006) eso puede ser explicado por la presencia de estímulos mecánicos, lo que concuerda con nuestro resultado, ya que el grupo ADL consumía más forraje que es una fuente de estimulación mecánica al rumen. Se ha demostrado que el consumo de alimento fibroso estimula el desarrollo muscular de la pared del rumen (Tamate et al., 1962) y promueve la rumia (Hodgson, 1971).

Diversos trabajos han mostrado el efecto de la administración de microorganismos en edades tempranas sobre el desarrollo del epitelio ruminal. Muya et al., (2015) demostró

que la administración del probiótico *Megasphaera elsdenii* a terneros lactantes, favoreció el desarrollo de las papilas (en anchura) y la densidad de las mismas sin que se produjesen cambios sustanciales en el grosor de la pared y en la longitud de las papilas ruminales. De forma similar, nuestro grupo de investigación demostró que la suplementación de los cabritos tras el nacimiento con cultivo activo de levaduras promovió un incremento en la longitud y anchura de papilas ruminales (Abecia et al., 2017). Otras publicaciones recientes también han demostrado que la administración de butirato sódico durante la lactancia o durante el post-destete indujo un mayor desarrollo anatómico de la pared y las papilas ruminales ejerciendo efectos positivos a largo plazo (Górka *et al.*, 2018). O'Hara et al., (2018) también demostraron que la suplementación del lacto-reemplazante con butirato favoreció el desarrollo microbiológico del tracto digestivo (rumen, ciego y colon) favoreciendo la presencia de *Butyrivibrio* y ejerciendo efectos positivos sobre la productividad de terneros. Por lo tanto, nuestros resultados parecen coincidir con estas publicaciones indicando que la compañía de animales adultos favoreció el desarrollo anatómico y microbiológico del rumen, posiblemente debido al efecto directo que ejercieron como fuente de inóculo o al efecto indirecto que ejerció la mayor concentración de butirato sobre el desarrollo anatómico y microbiológico del tracto digestivo.

Tabla 14: Peso de los componentes del tracto gastrointestinal (TGI)

		CTR	EE	Valor P
%TGI/peso vivo	CTL	24,99	0,63	0,008
	ADL	22,53	0,59	
%Rumen lleno/peso vivo	CTL	12,96	0,48	0,047
	ADL	11,59	0,45	
%Rumen lleno/TGI	CTL	51,68	0,94	0,767
	ADL	51,29	0,88	
%Rumen vacío/peso vivo	CTL	1,94	0,52	0,989
	ADL	1,94	0,05	
%Rumen vacío/TGI	CTL	7,80	0,24	0,014
	ADL	8,64	0,22	
%Omaso/peso vivo	CTL	0,86	0,04	0,822
	ADL	0,87	0,04	
%Omaso/TGI	CTR	3,45	0,18	0,062
	ADL	3,92	0,17	
%Abomaso/peso vivo	CTL	1,50	0,08	0,075
	ADL	1,3	0,07	
%Abomaso/TGI	CTL	6,02	0,29	0,515
	ADL	5,75	0,22	
%Intestino/peso vivo	CTL	9,58	0,27	0,005
	ADL	8,70	0,2	
%Intestino/TGI	CTL	38,54	0,94	0,884
	ADL	38,73	0,87	

Tras del sacrificio, a parte del análisis de histología ruminal, se determinaron los pesos de los órganos digestivos que constituyen el tracto gastrointestinal (TGI) (Tabla 14).

Cuando el peso de los diferentes órganos se expresó como porcentaje del peso vivo, los animales del grupo ADL presentaron un menor tamaño tanto del TGI completo (-9.8%; $P=0.008$), así como menor tamaño del rumen lleno (-10.54%) en comparación con el grupo CTL. Por contrario el abomaso representó un mayor porcentaje del peso vivo para el grupo ADL que para el grupo CTL (+13.6%). Sin embargo, la relación rumen vacío /

peso vivo no mostró diferencias porque los animales tenían pesos muy similares y un poco más altos con el grupo control, por eso, estudiar el peso del rumen vacío respecto al peso del tracto digestivo completo parece más interesante. Los resultados de este experimento mostraron que el peso medio del rumen vacío de los animales ADL fue mayor (+10.8%, $P=0,014$) que el observado en el grupo CTL. Esto se podría explicar por la estimulación sobre todo física que ha llevado a cabo el mayor consumo de forraje en este grupo (Heinrichs, 2005).

Estos resultados también concuerdan con los expuestos por Khan *et al.*, (2011), que observó que el efecto de alojar los terneros no destetados con otros mayores aumenta el peso y la capacidad física del rumen así como el tiempo de la rumia de estos terneros. Del mismo modo, Suárez *et al.*, (2007) mostraron que, entre los tratamientos de alimentación limitada, los terneros alimentados con una dieta *ad libitum* tuvieron un rumen con un mayor peso vacío que aquellos alimentados con dieta restringida.

Los animales ADL presentaron un peso desarrollo anatómico del rumen y omaso (expresados como % del peso del órgano respecto al TGI). Estos resultados pueden deberse a la mayor producción de butirato en el rumen de animales del grupo ADL, lo que concuerda con Muya *et al.* (2015), quien observó que a administración de probiótico *Megasphaera elsdenii* a terneros indujo una mayor concentración de butirato en el rumen y esto produjo un incremento del peso ruminal de 11%. El efecto positivo del butirato como aditivo sobre el desarrollo anatómico (Górka *et al.*, 2018) y microbiológico del rumen (O'Hara *et al.*, 2018) podría también explicar nuestros resultados ya que la presencia de mayores proporciones molares de butirato en los animales ADL, aunque en este caso de forma natural, fue la tónica del presente ensayo.

5. CONCLUSIONES

- La presencia de animales adultos acompañantes durante edades tempranas no ejerció ningún efecto negativo sobre el desarrollo ruminal ni sobre parámetros productivos durante la fase de lactancia.
- Por el contrario, dicha intervención favoreció el desarrollo microbiológico ruminal promoviendo la colonización protozoaria del rumen e incrementando la concentración ruminal de ácido butírico. Sin embargo, también ocasionó efectos negativos asociados a una mayor proteólisis ruminal que llevó a mayores concentraciones ruminales de amonio e iso-ácidos como producto de fermentación.
- Dichas diferencias fueron incrementándose desde la semana 5 de vida al destete (semana 7) y posteriormente en la fase de post-destete (semana 9) como fruto de una mayor ingestión de alimento sólido. Sin embargo, no tuvieron ninguna repercusión sobre parámetros productivos.
- La persistencia a largo plazo de dichos efectos fue escasa y no se observaron diferencias importantes en la fermentación ruminal ni en los parámetros productivos cuando los animales fueron alimentados con dietas ricas en concentrado o ricas en forraje.
- A pesar de ello, los animales criados con acompañantes adultos presentaron algunos aspectos positivos incluso a largo plazo como una menor producción de metano y una mayor digestibilidad de dietas forrajeras, así como un mayor desarrollo anatómico ruminal tanto en el tamaño del rumen como en el grosor de la pared ruminal, lo que podría representar una ventaja productiva en sistemas de producción con un mayor uso de alimento forrajero de calidad media/baja.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia, L., E. Jiménez, G. Martínez-Fernandez, A. I. Martín-García, E. Ramos-Morales, E., Pinloche E, Denman SE, Newbold CJ, Yáñez-Ruiz DR. 2017, Natural and artificial feeding management before weaning promote different rumen microbial colonization but not differences in gene expression levels at the rumen epithelium of newborn goats.
- Abecia L, Martín-García A, Martínez G, Newbold C & Yáñez-Ruiz D (2013) Nutritional intervention in early life to manipulate rumen microbial colonization and methane output by kid goats postweaning. *Journal of Animal Science* **91**: 4832-4840.
- Amos HE, Little CO & Mitchell GE (1971) Proline utilization during cellulose fermentation by rumen microorganisms. *Journal of agricultural and food chemistry* **19**: 112-115.
- Abecia, L., Ramos-Morales, E., Martínez-Fernandez, G., Arco, A., Martín-García, A. I., Alexandratos, N. and J. Bruinsma. 2012. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. ESA Working paper No. 12-03. Rome, FAO.
- Andries J, Buysse F, De Brabander D & Cottyn B (1987) Isoacids in ruminant nutrition: Their role in ruminal and intermediary metabolism and possible influences on performances—A review. *Animal Feed Science and Technology* **18**: 169-180.
- Belanche A, De la Fuente G, Moorby JM & Newbold CJ (2012) Bacterial protein degradation by different rumen protozoal groups. *Journal of Animal Science* **90**: 4495-4504.
- Bassi MS, Ladeira MM, Chizzotti ML, Chizzotti FHM, Oliveira DM, Neto ORM, et al. Grãos de oleaginosas na alimentação de novilhos zebuínos: consumo, digestibilidade e desempenho. *R Bras Zootec* 2012; 41(2):353-359.
- Beharka, A; Nagaraja, T; Morrill, J; Kennedy, G; Klemm, R. 1998. Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. *J. Dairy Sci.* 81:1946-1955.
- Belanche A, Abecia L, Holtrop G, Guada JA, Castrillo C, De la Fuente G & Balcells J (2011) Study of the effect of presence or absence of protozoa on rumen fermentation and microbial protein contribution to the chyme. *Journal of Animal Science*
- Belanche A, Doreau M, Edwards JE, Moorby JM, Pinloche E & Newbold CJ (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.

Belanche, A., J. Cooke, E. Jones, and C. J. Newbold. 2018. Short- and long-term effects of conventional vs artificial rearing on the health and performance of growing lambs. *Animal* 1:1-10.

Belanche A, Kingston-Smith A, Griffith G & Newbold C (2019) A multi-kingdom study reveals the plasticity of the rumen microbiota in response to a shift from non-grazing to grazing diets in sheep *Frontiers in microbiology*.

Bird SH, Hegarty R & Woodgate R (2010) Modes of transmission of rumen protozoa between mature sheep. *Animal Production Science* **50**: 414-417.

BJ Suárez CG Van Reenen N. Stockhofe J. Dijkstra WJJ Gerrits. 2006, Efecto de la fuente de roughage y la proporción de roughage a concentrado en el rendimiento animal y el desarrollo del rumen en terneros de ternera

Blaxter, K. L. and F. W Wainman. Utilization of food by sheep and cattle. *J. Agr. Sci.* 57: 419-422, 1964. bacteria. *J. Dairy Sci.* 46: 733-739, 1963.

Bøe & Færevik. 2003 Bøe KE, Færevik G. Agrupación y preferencias sociales en terneros, novillas y vacas. *Ciencia del comportamiento animal aplicada*. 80 (3): 175–190.

Buntyn J.O., Schmidt T.B., Nisbet D.J., Callaway T.R. 2016. The role of direct-fed microbials in conventional livestock production. *Annual Review of Animal Biosciences* 4: 335-355.

Burns JC. 2008. ASAS Centennial Paper: utilization of pasture and forages by ruminants: a historical perspective. *J Anim Sci* 86, 3647-3663.

Calsamiglia s, Bach A, Blas C, Fernández C, García-Rebollar p. Necesidades nutricionales para rumiantes de leche: Normas FEDNA. Madrid: Peninsular SL; 2009.

Cao G.T., Zeng X.F., Chen A.G., Zhou L., Zhang L., Xiao Y.P., Yang C.M. 2013. Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and caecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Poultry Science* 92(11): 2949–2955.

- Carmona CJ, Bolívar MD, Giraldo AL. 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Rev Col Cienc Pecu*;18:1(49–63).
- Castel J.M., Ruiz F.A., Mena Y., Sánchez M. 2005. La ganadería caprina en España: Evolución y perspectivas. *La Tierra-Cuadernos*: 26-32.
- Coleman GS, JI Laurie, JE Bailey, SA Holdgate. 1976. The Cultivation of Cellulolytic Protozoa Isolated from the Rumen. *J Gen Microbiol* 95, 144-150.
- Cook, R. M. and L. D. Miller. 1965, Utilization of volatile fatty acids in ruminants. 1. Removal of them from portal blood by the liver. *J. Dairy Sci.* 48: 1339-1345,
- Coverdale, J; Tyler, H; Quigley, J; Brumm, J. 2004. Effect of various levels of forage and form of diet on rumen development and growth in calves. *J. Dairy Sci.* 87:2554-2562.
- Crocker, L; DePeters, E; Fadel, J; Perez-Monti, H; Taylor, S; Wyckoff, J; Zinn, R. 1998. Influence of processed corn grain in diets of dairy cows on digestion of nutrients and milk composition. *J. Dairy Sci.* 81:2394-2407.
- Church, D.C. 1974, Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes (Vol.1) Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Daniel de Jesús Valerio Cabrera, 2009 análisis de competitividad del sistema ovino y caprino del noroeste de la república dominicana p 42
- Dashtban M, H Schraft, W Qin. 2009. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *Int J Biol Sci* 5, 578-595.
- De Passillé, A.M., F.T. Borderas, and J. Rushen. 2011. Weaning age of calves fed a high milk allowance by automated feeders: Effects on feed, water, and energy intake, behavioral signs of hunger, and weight gains. *J. Dairy Sci.* 94:1401–1408.
- De Paula Vieira, A., Guesdon, V., de Passillé, AM, von Keyserlingk, MAG y Weary, DM. 2008, Indicadores de comportamiento del hambre en terneras lecheras. *Apl. Anim Behav. Sci.*; 109: 180–189
- De Paula Vieira, M. A. G. von Keyserlingk , and D. M. Weary 2012, Presence of an older weaned companion influences feeding behavior and improves performance of dairy calves before and after weaning from milk p.3223

Dehority, B.A. 2002. Gastrointestinal tracts of herbivores, particularly the ruminant: anatomy, physiology and microbial digestion of plants. *Journal of Applied Animal Research*. 21(2), 145-160.

Dehority, TI. A. and H. W. Scott. 1967. Extent of cellulose and hemicellulose digestion in various forages by pure cultures of rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 50: 1136-1141,.

Dehority BA (1998) Microbial interactions in the rumen. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia* **15**: 69-86.

Dehority BA (1973) Hemicellulose degradation by rumen bacteria. Davis, C. L. : Cellulose utilization in the rumen. An introduction. *Federation Proceedings* **32**: 1819-1825.

Dijkstra, J., Mills, JAN y France, J. El papel del modelado dinámico en la comprensión de la contribución microbiana a la función del rumen. *Nutr. Res. Rev.* 2002 ; 15 : 67–90

Edford, A. & Gong, J. 2017. Implicaciones del butirato y sus derivados para la salud intestinal y la producción animal.

Dill-McFarland KA, Weimer PJ, Breaker JD & Suen G (2019) Diet influences early microbiota development in dairy calves without long-term impacts on milk production. *Appl Environ Microbiol* **85**: e02141-02118.

Elizondo, J. 2007. Alimentación y manejo del calostro en el ganado de leche. *Agronomía Mesoamericana* 18:271- 281.

Eóin O'Hara , Alan Kelly , Mateo S. McCabe , David A. Kenny , Le Luo Guan y Sinéad M. Waters. 2018 Efecto de un sustituto de la leche fortificada con butirato sobre la microbiota gastrointestinal y los productos de fermentación en terneros criados artificialmente al destete

Eric Pinloche, Neil McEwan, Jean-Philippe Marden, Corinne Bayourthe, Eric Auclair, Jamie. 2013, Newbold The Effects of a Probiotic Yeast on the Bacterial Diversity and Population Structure in the Rumen of Cattle

Evert. C. Duin, Tristan Wagner, Seigo shima, Divya Prakash, Bryan Cronin, David R. yañez-Ruiz. 2016, Mode of action uncovered for the specific reduction of methane

emissions from ruminants by the small molecule 3-nitrooxypropanoL. Proceedings of the National Academy of Sciences.

FAO. 2016. Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation by Y.S. Bajagai, A.V. Klieve, P.J. Dart & W.L. Bryden. Editor Harinder P.S. Makkar. *FAO Animal Production and Health Paper No. 179*. Roma, Italia.

FAO/WHO. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Faubladier,C., Julliand,V., Danel,J.,and Philippeau,C. 2013. Bacterial carbohydrate-degrading capacity in foal faeces: changes from birth to preweaning and the impact of maternal supplementation with fermented feed products. *Br.J.Nutr.* 110, 1040–1052.

Flores-córdova maría antonia, ramona p  rez leal, moiss  s basurto-sotelo y mar  a del rosario jurado-guerra. 2009, la leche de cabra y su importancia en la nutrici  n p 107.

Fondevila M, BA Dehority. 1996. Interactions between *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, and *Ruminococcus flavefaciens* in the digestion of cellulose from forages. *J Anim Sci* 74, 678-684.

Forrest, W. W. y D. J. Walker. 1971, *Advances in microbial physiology* la Edici  n, Academic Pres, e\N York. 5: 213-274.

Forsberg CW, LK Lovelock, L Krumholz, JG Buchanan-Smith. 1984. Protease activities of rumen protozoa. *Appl Environ Microbiol* 47, 101-110.

Fouhse, J.M., Smiegielski, L., Tuplin, M., Guan, L.L., and Willing, B.P. 2017. Host immune selection of rumen bacteria through salivary secretory IgA. *Frontiers in Microbiology*. 8, 848.

Funkhouser, L. J. & Bordenstein, S. R. 2013. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission.

Gaggia, F., Mattarelli, P. and Biavati, B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *J. Food Microbiol.*, 141:15–28.

Galef, B. G., and L. A. Giraldeau. 2001. Social influences on foraging in vertebrates: Causal mechanisms and adaptive functions. *Anim. Behav.* 61:3–15.

Galef, B. G., Jr. 1977. Social transmission of food preferences: An adaptation for weaning in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 91:1136– 1140.

Galef, BG Jr. 1994, Comunicaciones olfativas sobre los alimentos entre ratas: una revisión de hallazgos recientes. en: BG Galef, M. Mainardi, P. Valsecchi (Eds.) Aspectos del comportamiento de la alimentación. Harwood Academic Publishers GmbH, Chur, Suiza:83-101

Goad, D. W., Goad, C. L. & Nagaraja, T. G. 1998. Ruminant microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *Journal of Animal Science*. 76(1): 234-241.

Górka P, Kowalski Z, Zabielski R & Guilloteau P (2018) Invited review: use of butyrate to promote gastrointestinal tract development in calves. *Journal of dairy science* **101**: 4785-4800.

Grant & Albright. 2001, Grant R, Albright J. Efecto del agrupamiento de animales sobre el comportamiento de alimentación y la ingesta de ganado lechero. *Revista de Ciencia Lechera*. 2001; 84: E156 – E163.

Gressley TF., Hall, MB.I, Armentano, LE., 2011. Ruminant nutrition symposium: Productivity, digestion, and health responses to hindgut acidosis in ruminants., 4: 1120-1130

Gruby, D., and Delafond, H. M. O. 1843. Recherches sur des animalcules se développant en grand nombre dans l'estomac et dans les intestins, pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 17, 1304–1308.

Hcards dairyman. 2006, la saliva en la fisiología ruminal, sitio Argentino de Producción Animal

Heinrichs A (2005) Rumen Development in the Dairy Calf *Advances in Dairy Technology* **17**: 179-187.

Henderson Gemma, Cox Faith, Ganesh Siva, Jonker Arjan, Young Wayne, Global Rumen Census Collaborators y Janssen Peter H. 2015, Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range

Hodgson, J. 1971, El desarrollo de la ingesta de alimentos sólidos en terneros, El efecto de la experiencia previa de alimentos sólidos y la forma física de las dietas en el desarrollo de la ingesta de alimentos después del destete. *Anim Pinchar*.13: 15–24

- Hodrova B, J Kopečný, O Petr. 1995. Interaction of the rumen fungus *Orpinomyces jayonii* with *Megasphaera elsdenii* and *Eubacterium limosum*. *Lett Appl Microbiol* 21, 34-37
- Hoover, W. H., E. M. Kesler and R. J. Flipse. 1963. Carbon sources for in vitro protein synthesis by rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 46: 733-739.
- Hung A.T., Lin S.-Y., Yang T.-Y., Chou C.-K., Liu H.-C., Lu J.-J., Wang B., Chen S.-Y., Lien T.-F. 2012. Effects of *Bacillus coagulans* ATCC 7050 on growth performance, intestinal morphology, and microflora composition in broiler chickens. *Animal Production Science* 52(9): 874–879.
- Hungate R. E 1967. Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation. *Archives of Microbiology* 59, 158–164.
- Hungate, R. E. 1966. *The Rumen and its Microbes*. Nueva York, EEUU: Academic Press.
- Huntington, G. 1997. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *J. Anim. Sci.* 75:852-867.
- Ivan M, L Neill, T Entz. 2000. Ruminal fermentation and duodenal flow following progressive inoculations of fauna-free wethers with major individual species of ciliate protozoa or total fauna. *J Anim Sci* 78, 750-759
- Javier Frutos, Sonia Andrés 1, Erminio Trevisi, David R. Yáñez-Ruiz, Secundino López, Alba Santos and F. Javier Giráldez, 2018, Early Feed Restriction Programs Metabolic
- Jean Pierre Jouany et Pierre Thivend. 2008, la production de méthane d'origine digestive chez les ruminants et son impact sur le réchauffement climatique. 20; 259-274
- Jensen et al. 1997 Jensen MB, Vestergaard KS, Krohn CC, Munksgaard L. Efecto de la asignación de espacio para vivienda individual o grupal y la asignación de espacio en las respuestas de los terneros durante las pruebas de campo abierto. *Ciencia del comportamiento animal aplicada*. 1997; 54 (2–3): 109–121.
- JOUANY J.-P. 1994 les fermentations dans le rumen et leurs optimisation, INRA Station de Recherches sur la Nutrition des Herbivores Theix 63122 St Genès Champanelle, 7 (3) 208

Joy, M; DePeters, E; Fadel, J; Zinn, R. 1997. Effects of corn processing on the site and extent of digestion in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 80:2087-2097.

Kamra D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science* 89(1):124–35.

Kamra, D. N., Saha, S., Bhatt, N., Chaudhary, L. C. y Agarwal, N. 2003. Effect of diet on enzyme profile, biochemical changes and in sacco degradability of feeds in the rumen of buffalo. *Asian-Australasian journal of animal sciences.* 16(3): 374-379

Kaufmann, 1976 Fisiología digestiva del rumiante.

Kay, R.N.B. 1966. The influence of saliva on digestion in ruminants. In *World review of nutrition and dietetics*. Karger Publishers. 6, 292-325.

Khan, M. A., D. M. Weary, and M. A. G. von Keyserlingk. 2011. Hay intake improves performance and rumen development of calves fed higher quantities of milk. *J. Dairy Sci.* 94:3547–3553.

Khan, M; Weary, D; von Keyserlingk, M. 2011. Effects of milk ration on solid feed intake, weaning, and performance in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 94:1071-1081.

Kim M., Morrison M., Yu Z. 2011. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiology Ecology* 76(1):49–63.

Kingston-Smith AH, AH Marshall, JM Moorby. 2012. Breeding for genetic improvement of forage plants in relation to increasing animal production with reduced environmental footprint. *Animal* 1, 1-10.

Krause, K. M., and G. R. Oetzel. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology* 126: 215–236.

Lane M.A., Baldwin VI R.L., Jesse B.W. 2002. Developmental changes in ketogenic enzyme gene expression during sheep rumen development. *Journal of Animal Science* 80(6): 1538–44.

Látal, O., Pozdísek, J., Pechová, A. y Stybnarova, M. 2007. Influence of different rate of triticales meal in diet or ruminal protozoa number en cattle. *Vyzkum v chovu Skotu.* 49 (4): 30-33

Lesmeister, K; Heinrichs, A. 2005. Effects of adding extra molasses to a texturized calf starter on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. *J. Dairy Sci.* 88:411-418

- Liu Y and Whitman WB 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125, 171–189.
- Lucbert J., 2012. L'élevage des chèvres, GFA éditions, France, 330p
- M. Maekawa, K. A. Beauchemin, and D. A. Christensen 2002. Effect of Concentrate Level and Feeding Management on Chewing Activities, Saliva Production, and Ruminal pH of Lactating Dairy Cows 1173-1174
- M. Rey, Enjalbert, and V. Monteils. 2012, Establishment of ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves from birth through weaning
- Mauricio, R, M., Owen, E., Mould, F, L., Givens, I., Theodorou, M. K., France, J., Davies, D, R. y Dhanoa, m, s. 2001. Comparision of bovine rumen liquor and bovine feaces as inoculum for an in vitro gas production technique for evaluating forages. *Animal Feed Science and Technology*, 89 (1-2): 33-48
- McAllister TA, LM Rode, DJ Major, KJ Cheng, JG Buchanan-Smith. 1990. Effect of ruminal microbial colonization on cereal grain digestion. *Can J Anim Sci* 70, 571-579.
- McDougall, E.I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal*. 43(1), 99.
- Mendl & Held (2001) Mendl M, Held S. Vivir en grupos: una perspectiva evolutiva. En: Keeling LJ, Gonyou HW, editores. Comportamiento social en animales de granja. Nueva York, NY: Publicación CABI; 2001. pp. 7–36.
- Miranda-de La Lama G, Villarroel M & María G (2012) Behavioural and physiological profiles following exposure to novel environment and social mixing in lambs. *Small Ruminant Research* **103**: 158-163.
- Mizrahi, I. (2013). “Rumen Symbioses,” in *The Prokaryotes: Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations*. eds Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., and Thompson, F, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 533–544.
- Mohammad Jaber Alipour, Jonna Jalanka, Tiina Pessa-Morikawa, Tuomo Kokkonen, Moniello G, AJ Richardson, SH Duncan, CS Stewart. 1996. Effects of coumarin and sparteine on attachment to cellulose and cellulolysis by *Neocallimastix frontalis* RE1. *Appl Environ Microbiol* 62, 4666-4668.
- Morgavi DP, Forano E, Martin C & Newbold CJ (2010) Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* **4**: 1024-1036.

Morgavi DP, Popova M, Rathahao-Paris E & Boudra H (2014) Historical colonization events and age shape rumen microbial communities and metabolic phenotypes in lambs. (Rowett-INRA, ed.) p. 142. Aberdeen, UK.

Moreira, Thiago Simas de Oliveira Marques, Karolyna Oliveira Guimarães, Katia Cyrene Marchesín, Wilson Aparecido Bilego, Ubirajara Oliveira Freitas, Nulciene Firmino, 2016 Histología duodenal y características de canal de bovinos de corte suplementados con butirato de calcio y *Bacillus subtilis* p 61-67

Morvan B, Bonnemoy F, Fonty G and Gouet P 1996. Quantitative determination of H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea from digestive tract of different mammals. *Current Microbiology* 32, 129–133.

Mountzouris K. C., Balaskas C., Xanthakos I., Tzivinikou A., Fegeros K. (2009). Effects of a multi-species probiotic on biomarkers of competitive exclusion efficacy in broilers challenged with *Salmonella enteritidis*. *British Poultry Science*, 50(4): 467–478.

Murphy, T; Fluharty, F; Loerch, S. 1994. The influence of intake level and corn processing on digestibility and ruminal metabolism in steers fed all-concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 72:1608-1615.

Muya MC , Nherera FV , Miller KA , Aperce CC , Moshidi PM , Erasmus LJ . 2015, Efecto de la dosis de *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 sobre el desarrollo del rumen, la producción de ácidos grasos volátiles y el β -hidroxibutirato sanguíneo en los terneros neonatos.

Newbold CJ, de la Fuente G, Belanche A, Ramos-Morales E & McEwan N (2015) The role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in Microbiology* 6: 1-14.

Newbold, C. J., et al. 2014. Feeding management in early life influences microbial colonisation and fermentation in the rumen of newborn goat kids. *Anim. Prod. Sci.* 54, 1449–1454.

Nocek, J; Kesler, E. 1980. Growth and rumen characteristics of Holstein steers fed pelleted or conventional diets. *J. Dairy Sci.* 63:249-254.

Organización mundial de salud, 2006, Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación

O'Hara E, Kelly A, McCabe MS, Kenny DA & Waters SM (2018) Effect of a butyrate-fortified milk replacer on gastrointestinal microbiota and products of fermentation in artificially reared dairy calves at weaning. *Scientific reports* 8: 14901.

Palmonari, A., Stevenson, D, M., Mertens, D, R., Cruywagen, C, W. y Weimer, P, J. 2010. pH dynamics and bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows, *journal of dairy science*, 93 (1): 279-287

Pamela Castro-Flores, Jorge Alberto Elizondo-Salazar. 2012. Crecimiento y desarrollo ruminal en terneros alimentados con iniciador sometido a diferentes procesos 23, 343-352

Patra, A. K. 2010. Meta-analyses of effects of phytochemicals on digestibility and rumen fermentation characteristics associated with methanogenesis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(15):2700-2708.

Pereira, F. C., and Berry, D. 2017. Microbial nutrient niches in the gut. *Environ. Microbiol.* 19, 1366–1378

Peron. N. y Ruis, R. 1972. Rev. Cubana Ciencia Agri. Desarrollo Anatómico del tracto gastrointestinal. En terneros alimentados con basadas en miel y concentrados Vol. Pag. 77.

Phillips, C. J. 2004. The effects of forage provision and group size on the behavior of calves. *J. Dairy Sci.*, 87:1380–1388.

Pinloche, S. E. Denman, C. J. Newbold, and D. R. Yáñez-Ruiz. 2017. Natural and artificial feeding management before weaning promote different rumen microbial colonization but not differences in gene expression levels at the rumen epithelium of newborn goats.

Pitta DW, E Pinchak, SE Dowd, J Osterstock, V Gontcharova, E Youn, K Dorton, I Yoon, BR Min, JD Fulford, TA Wickersham, DP Malinowski. 2010. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microb Ecol* 59, 511-522.

Pounden, W. D., and J. W. Hibbs. 1948. The influence of the ration and rumen inoculation on the establishment of certain microorganisms in the rumens of young calves. *J. Dairy Sci.* 31:1041–1050.

Power, M. L., Quaglieri, C. & Schulkin, J., 2017. Reproductive microbiomes: a new thread in the microbial network. *Reprod. Sci.* 24,1482–1492,

Ranilla MJ, Jouany JP and Morgavi DP 2007. Methane production and substrate degradation by rumen microbial communities containing single protozoal species in vitro. *Letters in Applied Microbiology* 45, 675–680

Reetta Satokari, Ulla Hynönen, Antti Iivanainen & Mikael Niku, 2018, scientific report, the composition of perinatal microbiota in cattle

Revista: le blog de marthe montcho femmes-agriculture-développement rural. 2014

Revista: www.eluniversal.com

Revista: www.wfp.org Word food program. 2015

Reynolds C.K., Dürst B., Lupoli B., Humphries D.J., Beever D.E. 2004. Visceral tissue mass and rumen volume in dairy cows during the transition from late gestation to early lactation. *Journal of Dairy Science* 87(4): 961–71.

Russell JB, HC Mantovani. 2002. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4, 347-355.

Scollan, Rodolpho M. do Prado, Eduardo J. Pilau, Hilario C. Mantovani, Graeme T. Attwood, Joan E. Edwards, Neil R. McEwan, Steven Morrisson, Olga L. Mayorga, Christopher Elliott and Diego P. Morgavi. 2018 Addressing Global Ruminant Agricultural Challenges Through Understanding the Rumen Microbiome: Past, Present, and Future

Shaani, Y., Zehavi, T., Eyal, S., Miron, J., and Mizrahi, I., 2018. Microbiome niche modification drives diurnal rumen community assembly, overpowering individual variability and diet effects. *ISME J*.

Sharon A. Huws, Christopher J. Creevey, Linda B. Oyama, Itzhak Mizrahi, Stuart E. Denman, Milka Popova, Rafael Muñoz-Tamayo, Evelyne Forano, Sinead M. Waters, Matthias Hess, Ilma Tapio, Hauke Smidt, Sophie J. Krizsan, David R. Yáñez-Ruiz, Alejandro Belanche, Leluo Guan, Robert J. Gruninger, Tim A. McAllister, C. Jamie Newbold, Rainer Rohe, Richard J. Dewhurst, Tim J. Snelling, Mick Watson, Garret Suen, Elizabeth H. Hart, Alison H. Kingston-Smith, Nigel D.

Shabat SKB, Sasson G, Doron-Faigenboim A, Durman T, Yaacoby S, Miller MEB, White BA, Shterzer N & Mizrahi I (2016) Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. *The ISME journal* **10**: 2958.

Sheerli Kruger Ben Shabat Goor Sasson, Adi Doron-Faigenboim, Thomer Durman, Shamay Yaacoby, Margret E Berg Miller, Bryan Un Blanc, Naama ShterzerItzhak Mizrahi, 2016, Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants

Soberon, F., Rafrenato, E., Everett, R. W. and Van Amburgh, M. E. 2012. Prewaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves. *J. Dairy Sci.*, 95: 783–793.

Stewart CS, Flint HJ and Bryant MP 1997. The rumen bacteria. In *The rumen microbial ecosystem* (ed. PN Hobson and CS Stewart), pp. 10–72. Chapman y Hall, London.

Stewart, C S, Flint, H, J, y Bryant, M, P, 1997. The rumen bacteria, in the rumen microbial ecosystem, 10-72

Stewart, J. 1974, Cria de terneros. Boletín de Reseña. Serie Ganadería. Cida, 1:1-22.

Stobo, IJF, Roy, JHB, y Gaston, HJ. 1966, Desarrollo del rumen en la pantorrilla. 1. El efecto de las dietas que contienen diferentes proporciones de concentrados a heno en el desarrollo del rumen. *Br. J. Nutr.*; 20: 171–188

Suárez, B; Van Reenen, C; Stockhofe, N; Dijkstra, J; Gerrits, W. 2007. Effect of roughage source and roughage to concentrate ratio on animal performance and rumen development in veal calves. *J. Dairy Sci.* 90:2390- 2403

Suárez, B; Van Reenen, C; Gerrits, W; Stockhofe, N; van Vuuren, A; Dijkstra, J. 2006. Effects of supplementing concentrates differing in carbohydrate composition in veal calf diets: II. Rumen development. *J. Dairy Sci.* 89:4376-4386.

Tamate, H., McGilliard, AD, Jacobson, NL y Getty, R. Efecto de varias dietas sobre el desarrollo anatómico del estómago en la pantorrilla. *J. Dairy Sci.* 1962 ; 45 : 408–420

Tamate, H; McGilliard, A; Jacobson, N; Getty, R. 1962. Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf. *J. Dairy Sci.* 45: 408-420

Tokura M, Ushida K, Miyazaki K and Kojima Y 1997. Methanogens associated with rumen ciliates. *FEMS Microbiology Ecology* 22, 137–143.

Ushida K and Jouany JP 1996. Methane production associated with rumenciliated protozoa and its effect on protozoan activity. *Letters in Applied Microbiology* 23, 129–132.

Van Soest., P. J.1994. Nutricional Ecology of th ruminant. Ithaca, NY, EEUU: Cornell University Press

Wallace, R. J., y M. A. Cotta. 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. Pág. 217-250 en: The rumen microbial ecosystem. P. N. Hobson, Ed. Elsevier Applied Science, NY.

Wang, Y.H., Xu, M., Wang, F.N., Yu, Z.P., Yao, J.H., Zan, L.S. and Yang, F.X. 2009 Effect of dietary starch on rumen and small intestine morphology and digesta pH in goats. Livest. Sci., 122(1): 48-52

Warner, R.G. (1961): Is hay required to develop rumen capacity S. Dairy Sci, 44: 1172-1185.

Warner, RG, Flatt, WP y Loosli, JK. 1956, Factores dietéticos que influyen en el desarrollo del estómago del animal. *J. Agric. Food Chem.* 4 : 788–792

Weimer, P. J. (2015). Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. *Frontiers in microbiology* 6:296.

Weston, R. H. and J. P. Hogan. (1968), The digestion of pasture plants by sheep. I. Ruminal production of volatile fatty acids by sheep offered diets of rye grass and forage oats. *Aust. J. Agr. Res.* 19: 419- 432

Williams, A. G., and Coleman, G. S. 1997. The rumen protozoa, in *The Rumen Microbial Ecosystem*, eds P. N. Hobson, and C. S. Stewart

Winter, K.A. Comparative performance and digestibility in dairy calves weaned at three, five, and seven weeks of age. *Can. J. Anim. Sci.*1985; 65: 445-450

Xu, J., Chen, X., Yu, S., Su, Y. y Zhu, W. 2016. Efectos de la intervención temprana con butirato de sodio sobre la microbiota intestinal y la expresión de citocinas inflamatorias en cochinitos neonatales.

Yáñez-Ruiz David R, Leticia Abecia and Charles J. Newbold. 2015 Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review

Yáñez-Ruiz David R. y Belanche García Alejandro, 2017, Factores nutricionales que influyen en la microbiota en ruminantes

Yañez-Ruiz DR, Hart KJ, Martin-Garcia AI, Ramos S and Newbold CJ. 2008. Diet composition at weaning affects the rumen microbial population and methane emissions by lambs. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48, 186–188

Yañez-Ruiz, D. R., B. Macias, E. Pinloche, and C. J. Newbold. 2010. The persistence of bacterial and methanogenic archaeal communities residing in the rumen of young lambs. *Fems Microbiology Ecology* 72(2):272-278.

Yang, CMJ Respuesta de la degradación de la fibra del forraje por microorganismos ruminales a los ácidos grasos volátiles de cadena ramificada, aminoácidos y dipéptidos. *J. Dairy Sci.* 2002; 85 : 1183-1190

Yeoman, C. J., S. L. Ishaq, E. Bichi, S. K. Olivo, J. Lowe, and B. M. Aldridge. 2018. Biogeographical Differences in the Influence of Maternal Microbial Sources on the Early Successional Development of the Bovine Neonatal Gastrointestinal tract. *Scientific reports* 8(1):3197.

Zhang, J., Zhao, S., Zhang Sun, P., Bu, D., and Wang, J. 2015. New primers targetting full-length ciliate 18S rRNA genes and evaluation of dietary effect on rumen ciliate diversity in dairy cows. *Curr. Microbiol.* 71, 650–657.

Zhou, M., Y.-J. Peng, Y. Chen, C. M. Klinger, M. Oba, and J.-X. Liu. 2018. Assessment of microbiome changes after rumen transfaunation: implications on improving feed efficiency in beef cattle. *Microbiome* 6(1):62.

Zinn RA, Owens FN. Influence of feed intake level on site of digestion in steers fed a high concentrate diet. *J Anim Sci* 1983; 56:471-5.

Zitnan, R., Kuhla, S., Nurnberg, K., Schoenhusen, U., Ceresnakova, Z., Sommer, A., Baran, M., Greserova, G. and Voigt, J. 2003, Influence of the diet on the morphology of ruminal and intestinal mucosa and on intestinal carbohydrase levels in cattle. *Vet. Med.*, 48: 177-182.

