EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE MICROBIOTA RUMINAL A EDADES TEMPRANAS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LECHE Y FERMENTACIÓN RUMINAL DURANTE LA PRIMERA LACTACIÓN

Belanche, A., Palma-Hidalgo, J.M., Martín-García, A.I. y Yáñez-Ruiz, D.R.
Estación Experimental del Zaidin, CSIC. C/ Profesor Albareda 1, 18008, Granada, España;
a.belanche@csic.es

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente el uso de probióticos en rumiantes se ha centrado en animales adultos altamente productivos para prevenir acidosis ruminal o incrementar la productividad. Entre ellos, el más ampliamente utilizado es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* dada su capacidad para consumir oxígeno y favorecer la proliferación ruminal de microorganismos degradadores de fibra y consumidores de lactato (Newbold *et al.*, 1996). Sin embargo, los resultados productivos del uso de probióticos en animales adultos son altamente variables y dependientes del tipo de animal, nivel productivo y tipo de dieta, además de precisar de un tratamiento continuado. Esta elevada variabilidad de resultados parece deberse a la inherente dificultad de modificar una microbiota ruminal estable y altamente redundante típica del animal adulto (Weimer, 2015).

Por contrario, el proceso de colonización microbiana del tracto digestivo que ocurre tras el nacimiento podría representar una oportunidad para inducir cambios duraderos en la microbiota ruminal, dado que durante ese proceso se establece el reconocimiento de dicha microbiota por parte del sistema inmunitario del hospedador (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2015). Como consecuencia, el uso de probióticos en rumiantes jóvenes ha arrojado resultados positivos consistentes y encaminados a favorecer la salud intestinal y el desarrollo ruminal. En animales jóvenes los probióticos más utilizados son microorganismos intestinales como *Bacillus, Lactobacillus* y *Enterococcus*, sin embargo, la inoculación de microrganismos ruminales a modo de probiótico ha sido mucho menos estudiada.

En un reciente estudio *in vitro* estudiamos los factores que determinan la actividad de la microbiota ruminal (Belanche *et al.*, 2019). Los resultados demostraron que el líquido ruminal fresco procedente de animales alimentados con dietas ricas en concentrado y muestreado a 3h tras la ingestión de alimento, representa la microbiota ruminal más activa y por lo tanto con un mayor potencial para ser utilizada como probiótico. En base a ello realizamos un siguiente estudio en el que crías de cabra recién nacidas fueron inoculadas diariamente con diferentes tipos de líquido ruminal (Belanche *et al.*, 2018). Los resultados de este ensayo mostraron que la inoculación de animales jóvenes con líquido ruminal fresco aceleró la colonización microbiana del rumen, la instauración de la función ruminal y ejerció efectos positivos durante la fase de destete. Sin embargo, la persistencia de estos efectos a largo plazo era desconocida.

Por lo tanto, el objetivo de este ensayo es continuar con dicho estudio para evaluar la persistencia de los efectos a largo plazo en animales adultos. Para ello se realizó un seguimiento de las cabras inoculadas a edades tempranas con microbiota ruminal durante su primera lactación para valorar el impacto de dichas intervenciones sobre la fermentación ruminal, la producción de leche y la composición de la misma.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 32 cabras recién nacidas de la raza Murciano-Granadina que se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos de 8 animales cada uno. El primero fue inoculado diariamente desde el día 1 al 70 con líquido ruminal autoclavado a modo de prebiótico (AUT), líquido ruminal fresco adaptado a una dieta rica en concentrado (LRC), liquido ruminal fresco adaptado a una dieta forrajera (LRF), y ausencia de inoculación (CTL). El inóculo se extrajo diariamente de cabras adultas canuladas a nivel ruminal y alimentadas con una dieta rica en concentrado (33:77 ratio F:C) o 100% forraje (heno de alfalfa). El líquido ruminal, tras ser filtrado, fue dosificado oralmente a razón de 1 ml/kg PV. Los grupos experimentales se mantuvieron físicamente separados durante el transcurso de todo el experimento, pero manejados de forma idéntica. Los animales fueron destetados a las 7 semanas de edad, y tras ser engordados durante 8 meses, fueron inseminados y comenzaron la lactación a los 15 meses de edad. La tasa de fertilidad fue del 75% por lo que se dispuso de 6 animales

lactantes y 2 animales no-lactantes para cada grupo experimental. Durante toda la lactación las cabras fueron alimentadas con heno de alfalfa *ad libitum*, mientras que la cantidad de concentrado fue de 1,2, 0,6 y 0 kg/d por animal durante el primer (1-50 días en leche), segundo (51-100 días en leche) y tercer tercio de la lactación (101-150 días en leche), respectivamente, con el objetivo de evaluar los efectos bajo varias situaciones nutricionales.
Durante toda la lactación se registró diariamente la producción de leche individual y se tomaron muestras semanales para determinar la composición química. Durante los últimos 7 días de cada tercio de gestación se realizó un control individual de la ingestión y se tomaron muestras de contenido ruminal a los 50, 100 y 150 días en leche, respectivamente. La extracción de contenido ruminal se realizó por sondaje oro-gástrico a las 09:00h antes de que los animales recibiesen el alimento concentrado. Dicho contenido ruminal fue filtrado, se midió inmediatamente el pH y se tomaron muestras para determinar la concentración ruminal de amonio, lactato y ácidos grasos volátiles (AGV). Tras realizar el promedio de los tres muestreos, los datos de la fermentación ruminal fueron sometidos a un análisis de varianza en el que se consideró el tipo de inoculación (CTL *vs.* PRE *vs.* LRC *vs.* LRF) como efecto fijo y el estado fisiológico (láctate *vs.* no-lactante) como bloque (n=8). Para los datos de la producción lechera, el tipo de inoculación fue considerado como efecto fijo y el tipo de parto (simple *vs*. múltiple) como bloque (n=6). La producción de leche corregida para el contenido en energía fue calculada para un 4% de grasa y 3,3% de proteína (Gerber *et al.*, 2011), mientras que la eficiencia de conversión se determinó como el cociente entre la producción de leche corregida y la ingestión individual.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inoculación con líquido ruminal autoclavado, a modo de prebiótico, originó un incremento en la concentración molar de butirato en el rumen (+12%) en comparación con el grupo CTL (P<0,001), mientras que el resto de los parámetros ruminales fueron similares para ambos tratamientos (Tabla 1). La inoculación de líquido ruminal fresco a modo de probiótico (tratamientos LRC y LRF) ocasionó un incremento incluso superior en la proporción de butirato en el rumen (+31%) con respecto al grupo CTL. El incremento de butirato (principalmente a expensas de propionato) es considerado un signo de una mayor actividad fibrolítica en el rumen (Noziere *et al.*, 2011), principalmente asociado a la presencia de una mayor cantidad o actividad de los protozoos ruminales (Newbold *et al.*, 2015). Además, dicho incremento en butirato en los tratamientos LRC y LRF fue acompañado de un descenso sustancial en la concentración ruminal de lactato (-25%) en comparación con el grupo control. Una menor concentración de lactato en los animales inoculados podría indicar un efecto preventivo frente a la acidosis ruminal, posiblemente porque los carbohidratos solubles son almacenados o consumidos por una microbiota más diversa, en vez de ser trasformados en lactato como producto de fermentación en el grupo CTL. Además, los tratamientos LRC y LRF indujeron un descenso en la concentración ruminal de iso-butirato (-21%) e iso-valerato (-27%). Ambos ácidos grasos ramificados proceden mayoritariamente de la degradación de proteínas en el rumen (Firkins, 1996), por lo que su descenso parece indicar una menor proteólisis ruminal.
En lo referido a parámetros productivos, no se encontraron diferencias entre tratamientos en la ingestión de alimento, producción de leche, producción de leche corregida o eficiencia de conversión (P>0,05). Tampoco se encontraron diferencias en la composición de la leche en lo que concierne al nivel de proteína en leche, lactosa, extracto seco y células somáticas. Sin embargo, la inoculación con líquido ruminal fresco ejerció un efecto positivo sobre el porcentaje de grasa en leche ocasionando un incremento significativo (+5,1%) respecto al grupo control. Dicho incremento en el contenido de grasa en leche es compatible con el incremento de la concentración ruminal de butirato dada la naturaleza lipogénica de dicho producto de fermentación. No se encontraron diferencias entre los tratamientos LRC y LRF, por lo que los efectos de la inoculación temprana con microbiota ruminal parecen ser independiente del tipo de microbiota utilizada como inóculo.
En conclusión, este ensayo demostró que la programación microbiana del rumen es posible mediante intervenciones nutricionales a edades tempranas permitiendo modular parcialmente la fermentación ruminal o la calidad de la leche. Estos resultados deberían ser validados utilizando un mayor número de animales.

***Tabla 1**. Efecto de la inoculación de diferentes tipos de microbiota ruminal a edades tempranas sobre la fermentación ruminal durante la primera lactación.*

	CTL	AUT	LRC	LRF	SED	Valor *P*
Fermentación ruminal						
pH	7,24	7,19	7,19	7,13	0,081	0,618
mg NH3-N/100ml	14,8	16,2	14,1	13,2	1,328	0,186
Lactato (mM)	0,57^{b}	0,59^{b}	0,37^{a}	0,48^{ab}	0,056	0,001
AGV totales (mM)	44,2	45,1	50,3	50,4	4,590	0,377
Acetato (%)	65,6	65,9	65,5	66,2	0,652	0,659
Propionato (%)	16,9	16,5	15,3	15,5	0,764	0,124
Butirato (%)	9,24^{a}	10,3^{b}	12,5^{c}	11,8^{c}	0,426	<0,001
Iso-butirato (%)	2,94^{b}	2,58^{ab}	2,36^{a}	2,27^{a}	0,254	0,054
Valerato (%)	1,54	1,45	1,61	1,47	0,086	0,229
Iso-valerato (%)	3,71^{c}	3,35^{bc}	2,73^{ab}	2,69^{a}	0,302	0,004
Productividad						
Ingestión (kg MS/d)	1,55	1,63	1,58	1,62	0,114	0,888
Leche (kg/d)	1,21	1,41	1,13	0,95	0,268	0,448
Leche corregida (kg/d)	1,28	1,44	1,25	1,02	0,280	0,546
Grasa (%)	4,44^{b}	4,09^{b}	4,73^{a}	4,61^{ab}	0,207	0,040
Proteína (%)	3,59	3,64	3,65	3,46	0,163	0,612
Lactosa (%)	4,75	4,75	4,68	4,77	0,078	0,551
Extracto seco (%)	13,6	13,4	13,9	13,6	0,326	0,411
Cél. somáticas (log/ml)	5,32	5,01	5,61	5,60	0,264	0,124
Eficiencia (kg/kg)	0,82	0,86	0,77	0,62	0,137	0,360

CTL: control sin inoculación; AUT, líquido ruminal autoclavado; LRC, líquido ruminal adaptado a dieta rica en concentrado; LRF, líquido ruminal adaptado a dieta forrajera. Dentro de una misma línea, letras distintas denotan diferencias significativas (P<0,05)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Belanche, A. et al. 2018 Ann. Nutr. Metab. 72: 1-76 • Belanche, A. et al. 2019 J. Sci. Food Agric. 99: 163-172 • Firkins, J. L. 1996 J. Nutr **126**: 1347-1354 • Gerber, P. et al. 2011 Lives. Sci. **139**: 100-108 • Newbold, C. J. et al. 1996 Br. J. Nutr. **76**: 249-261 • Newbold, C. J. et al. 2015 Front. Microbiol. **6**: 1-14 • Noziere, P. et al. 2011 Animal **5**:403-414 • Weimer, J. P. 2015 Front. Microbiol. **6**:1-16 • Yáñez-Ruiz, D. R. 2015 Front. Microbiol. 6: 1-12

EFFECT OF EARLY-LIFE INOCULATION OF RUMEN MICROBIOTA ON THE RUMEN FERMENTATIO AND MILK YIELD DURING THE FISRT LACTATION IN DAIRY GOATS

ABSTRACT: A total of 32 newborn Murciano-Granadina kids were randomly divided into four groups and daily inoculated during 11 weeks with autoclaved rumen fluid (AUT), fresh rumen fluid from adult animals adapted to either concentrate (LRC) or forage diets (LRF) and absence of inoculation (CTL). Experimental groups were kept physically separated. Milk yield and composition were recorded throughout the first lactation and rumen samples were taken at 50, 100 and 150 days in milk. Results indicated that AUT goats had higher rumen butyrate proportion (+12%) than CTL goats. Treatments LRC and LRF promoted an even greater increment in butyrate levels (+31%) suggesting a high protozoal activity. Treatments LRC and LRF also had lower levels of rumen lactate (-25%), iso-butyrate (-21%) and iso-valerate (-27%) than the CTL group. No differences across treatments were noted in terms of feed intake, milk yield and feed efficiency. However, LRC and LRF goats had higher milk fat content (+5.1%); possibly due to a greater fibrolytic activity derived from a more complex microbial community. No differences were noted between LRC and LRF treatments. These results suggest that rumen microbial programing through early-life interventions is possible in order to modulate rumen fermentation or milk quality in later life.

Keywords*:* dairy goats, early-life intervention, milk yield, rumen fermentation