

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE  
LÍQUIDO RUMINAL (FÍSTULA vs Sonda) A PARTIR DE LA  
POBLACIÓN BACTERIANA OBTENIDA EN VACAS  
PRIMIPARAS DURANTE EL PERIODO DE TRANSICIÓN**

**por**

**Santiago Nahuel TECHERA PINTOS**

**Trabajo final de grado  
presentado como uno de los  
requisitos para obtener el  
título de Ingeniero Agrónomo**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2025**

Este Trabajo Final de Grado se distribuye bajo licencia  
“Creative Commons **Reconocimiento – No Comercial**”.



**Página de aprobación**

Trabajo final de grado aprobado por:

Director/a:

---

Ing. Agr. (Dr.) Diego Antonio Mattiauda Mele

Director/a:

---

Lic. Biol. (Dr.) Hugo Naya

Tribunal:

---

Ing. Agr. (Mag.) María de los Ángeles Bruni Borrone

---

DMV. (Dr.) Alberto Casal

---

Lic. Biol. (Dr.) Hugo Naya

Fecha:

30 de diciembre de 2025

Estudiante:

---

Santiago Nahuel Techera Pintos

### **Agradecimientos**

A mis tutores, Diego Mattiauda y Hugo Naya, por hacer de este proceso un constante aprendizaje, por fomentar el criterio y la investigación.

A Tamara Fernández, por su amabilidad, incansable paciencia, y por sus largas horas de dedicación para aportar a este trabajo y a mi formación.

A Alberto Casal por su gran aporte en el trabajo de campo, y por transmitir conocimiento. A María de los Ángeles, por enseñar y contribuir en esta producción. A Agustina, Fernando, Lucas, por transmitir lo que saben y ser parte fundamental de la operativa diaria en el campo.

Al personal de la EEMAC, por su compañerismo y esfuerzo durante tantos meses en el campo para que el trabajo se diera lo mejor posible.

A Lucía, Carolina, Ana, Anaclara y Tomas, tesistas con los que compartí en este proyecto, por su dedicación y esfuerzo en largas horas de trabajo de campo, y por su compañerismo y gratos momentos de distracción.

Muy especialmente a mis padres y hermano, pilares fundamentales en estos años de construcción. Gracias, por lo que fue y por lo que vendrá, por confiar y apoyar en cada paso, por estar.

A Alen, Diego, Ignacio, Yoel, y a sus familias, con quienes compartimos tantas horas de estudio en esta carrera.

A Diego, María Elena, Gabriel, y Alejandro, por darme la oportunidad de acercarme a la agronomía, a sus familias, y a sus vidas mientras realizaba este trabajo.

A Sara, con quien comparto la pasión por las ciencias agrarias, por su apoyo en el día a día y por las largas horas de discusión en torno a este trabajo.

***“Piedra soy, y ando rodando pa’ encontrarme con las piedras” O.R.C***

## Tabla de contenido

Página de aprobación.....	3
Agradecimientos.....	4
Lista de figuras y tablas .....	8
Resumen.....	11
Abstract .....	13
1. Introducción.....	15
2. Revisión Bibliográfica .....	17
2.1 Características globales del sector .....	17
2.2 La producción lechera en Uruguay.....	17
2.2.1 Evolución.....	17
2.2.2 Caracterización de los sistemas de producción .....	18
2.3 Alimentación de la vaca lechera .....	19
2.3.1 Característica de los alimentos .....	20
2.3.2 Requerimientos nutricionales de la vaca .....	25
2.4 Generalidades sobre el ambiente y la comunidad microbiana del rumen.....	28
2.5 La importancia del periodo de transición y su relación con los microorganismos procariotas del rumen .....	30
2.6 Las bacterias ruminales .....	32
2.6.1 Principales grupos de bacterias ruminales .....	33
2.6.2 Principales géneros y especies de bacterias ruminales .....	35
2.7 Métodos de obtención de muestras de líquido ruminal en vacas lecheras para el estudio del microbioma .....	37
2.8 Métodos de identificación microbiana.....	39
2.8.1 Método molecular, análisis del ARNr 16S y secuenciación de amplicón.....	40
2.8.2 Análisis bioinformático .....	41

2.9 Un antecedente importante en el estudio de bacterias ruminales .....	41
3. Materiales y métodos .....	43
3.1 Ubicación espacial y temporal .....	43
3.2 Diseño experimental .....	43
3.3 Manejo general .....	44
3.3.1 Ingreso de animales al experimento .....	44
3.3.2 Cama caliente .....	44
3.3.3 Alimentación .....	45
3.3.4 Ordeño .....	46
3.3.5 Ajustes circunstanciales .....	47
3.4 Muestreo .....	47
3.4.1 Extracción de muestras.....	47
3.4.2 Conservación de muestras.....	48
3.5 Extracción de ADN.....	48
3.6 Secuenciación del gen 16S.....	48
3.7 Procesamiento y evaluación de los datos de secuenciación .....	49
4. Resultados y Discusión .....	51
4.1 Cantidad de muestras.....	51
4.2 Cantidad de reads obtenidos .....	51
4.3 Riqueza y abundancia relativa de los reads en función de los ASVs una vez aplicado el primer filtro .....	55
4.4 Cantidad y porcentaje de secuencias clasificadas en los distintos taxones una vez aplicado el primer filtro.....	58
4.5 Diversidad alfa de ASVs para los 4 grupos de variación (método de extracción, momento de muestreo, vaca, tratamiento) una vez aplicado el primer filtro .....	58
4.6 Análisis de coordenadas principales (PCoA) a nivel de ASVs una vez aplicado el primer filtro .....	61

4.7 Diversidad alfa a nivel de géneros para tres grupos de variación una vez aplicado el primer filtro.....	64
4.8 PCoA a nivel de géneros una vez aplicado el primer filtro .....	66
4.8 Principales géneros detectados en cada momento de muestreo una vez aplicado el segundo filtro.....	67
.....	72
4.9 Comparación general de las abundancias de los distintos géneros según el método de muestreo (sonda vs fístula) una vez aplicado el segundo filtro .....	73
4.10 Correlación de Pearson y Spearman para los métodos de muestreo a nivel de géneros .....	76
4.11 Análisis de expresión diferencial de géneros una vez aplicado el segundo filtro .....	79
4.12 Análisis de redundancia (RDA) a nivel de géneros una vez aplicado el segundo filtro ...	81
4.13 Análisis y observaciones principales sobre la estabilidad del método alternativo mediante la utilización del %CV una vez aplicado el segundo filtro.....	86
4.14 Zona de estabilidad y determinación del punto crítico de abundancia una vez aplicado el segundo filtro.....	88
4.15 Observación de las señales biológicas del método alternativo una vez aplicado el segundo filtro.....	88
5. Conclusión .....	91
6. Bibliografía.....	92

### Lista de tablas y figuras

<b>Tabla 1</b> Caracterización de tambos del Proyecto de Producción Competitiva de Conaprole (PPC) entre 2013 a 2017 .....	18
<b>Tabla 2</b> Resumen de información nacional de composición química de gramíneas y leguminosas .....	22
<b>Tabla 3</b> Composición de dietas suministradas en preparto (TMR) y posparto (PMR) .....	46
<b>Tabla 4</b> Resultado del análisis de la composición química de las pasturas ofrecidas .....	46
<b>Tabla 5</b> Detalle del número de muestras analizadas .....	51
<b>Tabla 6</b> Números de secuencias de cada muestra que sobreviven a cada paso del “pipeline” de DADA2 .....	52
<b>Tabla 7</b> Promedio descriptivo por condición de muestreo para cada paso del “pipeline” de DADA2 .....	53
<b>Tabla 8</b> Muestras que no lograron secuenciarse .....	53
<b>Tabla 9</b> Cantidad de taxones detectados en cada categoría y porcentaje promedio de secuencias clasificadas por categoría .....	58
<b>Tabla 10</b> Microbioma central según géneros detectados en cada momento de muestreo .....	68
<b>Tabla 11</b> Abundancia de géneros microbianos según método de muestreo para los momentos de toma de muestra .....	74
<b>Tabla 12</b> Correlación media de Pearson y Spearman según el momento de muestreo para Fístula y Sonda .....	77
<b>Tabla 13</b> Análisis de expresión diferencial de géneros según el método de muestreo .....	79
<b>Tabla 14</b> RDA a nivel de géneros para momento de muestreo, método de muestreo, vaca .....	82
<b>Tabla 15</b> Abundancias (%) promedio sonda/fístula y %CV entre los métodos para cada género mencionado .....	84
<b>Tabla 16</b> Dispersión de abundancias relativas de géneros según método de muestreo para los tres momentos .....	86
<b>Tabla 17</b> Resumen estadístico del %CV según rangos de abundancia relativa de géneros microbianos .....	88



<b>Tabla 18</b> Perfil microbiano central logrado por cada método de extracción en el parto (-30 días).....	89
<b>Tabla 19</b> Perfil microbiano central logrado por cada método de extracción en el posparto (+35 días).....	89
<b>Tabla 20</b> Perfil microbiano central logrado por cada método de extracción en el posparto (+65 días).....	90
<b>Figura 1</b> <i>Evolución de número de productores, producción anual y superficie explotada en el período 2001-2020</i> .....	17
<b>Figura 2</b> Producción, consumo y peso de vacas lecheras a lo largo de la lactancia .....	27
<b>Figura 3</b> Curvas de rarefacción de muestras según número de reads analizados y los ASVs observados .....	54
<b>Figura 4</b> Curvas de riqueza y abundancia relativa para método de muestreo y momento de muestreo .....	55
<b>Figura 5</b> Curvas de riqueza y abundancia relativa por vaca y por tratamiento.....	56
<b>Figura 6</b> Diversidad alfa de ASVs para método de muestreo y momento de muestreo .....	59
<b>Figura 7</b> Diversidad alfa de ASVs por tratamiento.....	60
<b>Figura 8</b> Análisis de PCoA a nivel de ASVs .....	62
<b>Figura 9</b> Análisis de PCoA a nivel de ASVs .....	63
<b>Figura 10</b> Diversidad alfa de géneros para método de muestreo y momento de muestreo.....	64
<b>Figura 11</b> Diversidad alfa por tratamientos .....	65
<b>Figura 12</b> Análisis de PCoA para los factores momento de extracción y método de extracción .....	66
<b>Figura 13</b> Ratio de variación respecto al promedio general de cada género del microbioma central .....	72
<b>Figura 14</b> Comparación global de abundancias relativas por género entre métodos de muestreo .....	76
<b>Figura 15</b> Comparación de abundancias relativas de géneros por momento de muestro para los métodos de extracción.....	77

<b>Figura 16</b> Expresión diferencial de géneros microbianos para método de muestreo según abundancia absoluta media .....	81
<b>Figura 17</b> “Loadings” de los géneros microbianos sobre los dos ejes principales del dbRDA ....	83
<b>Figura 18</b> Asociación entre %CV de métodos y abundancia relativa de géneros para los momentos de muestreo.....	87

## Resumen

La búsqueda de mejorar la eficiencia y sustentabilidad de la producción lechera ha llevado a investigar el complejo sistema del microbioma ruminal, y en este contexto, la extracción de muestras de líquido ruminal representa un paso crítico. El método estándar de extracción es por medio de fístula ruminal, ofrece un muestreo preciso, pero implica un cuestionamiento metodológico ante el bienestar animal y mayor dificultad de realizar muestreos masivos, ya que implica cirugía a nivel del hueso del ijar. Como alternativa, la sonda oro-ruminal es un método menos invasivo y más práctico para obtener múltiples muestras. El objetivo fue comparar el uso de sonda oro-ruminal frente a fístula ruminal como metodología de muestreo para caracterizar la comunidad microbiana procariota del rumen en vacas Holando primíparas durante el periodo de transición, evaluando similitudes y diferencias en la composición y estructura microbiana en tres momentos alrededor del parto (-30, +35 y +65 días). Nueve vaquillonas Holando-americano canuladas en rumen se sometieron a extracción de líquido ruminal mediante ambos métodos en los tres momentos en torno al parto. Las muestras se realizaron en el horario de la mañana con los animales en ayuno. Cada muestra se colocó en un tubo estéril y rotulado de 50 ml. Estas muestras se centrifugaron a 10.000 rpm, 4°C, durante 10 minutos y se extrajo el material sedimentado con la utilización de pipetas estériles, trasegando en 2 frascos (estériles y debidamente rotulados) de 2 ml cada uno. Estos frascos pequeños son la muestra evaluada y se conservaron a -80°C. La población microbiana de cada muestra se detectó mediante la amplificación de las regiones variables V3-V4 del gen 16S y su secuenciación paired-end con la plataforma MiSeq de Illumina. El objetivo fue agrupar las secuencias a nivel de ASVs (Amplicon Sequence Variants) para lograr caracterizar los grupos taxonómicos a nivel de géneros microbianos mediante la base de datos pública Silva (versión 138.2). Para los análisis estadísticos se utilizó el paquete DADA2 del software estadístico R (versión 4.3.1). Las curvas de rarefacción demostraron que la profundidad de secuenciación fue adecuada. La riqueza y la diversidad de ASVs y de géneros microbianos no presentaron diferencias significativas entre métodos de muestreo ( $p > 0,05$ ). Las correlaciones medias de Pearson y Spearman según el momento de muestreo para las abundancias relativas de géneros microbianos mediante fístula y sonda fueron altas ( $r > 0,7$ ), pero disminuyeron desde el parto hacia el posparto. El análisis de expresión diferencial demostró que ninguno de los géneros evaluados presentó diferencias entre métodos ( $p_{adj} > 0,05$ ). El %CV de las abundancias relativas de géneros entre los métodos de muestreo aumentó según el momento de muestreo, pasando de 8,7% en el momento -30 a 15,4% en +35, y 26,6% en +65. En promedio la sonda compartió el 85,8% de los géneros centrales que detecta el método de extracción por fístula. El uso de sonda oro-ruminal, logró caracterizar

y ofrecer una buena señal biológica sobre los microorganismos del líquido ruminal, lo que alienta a sugerir que es una alternativa confiable para evaluación del ambiente ruminal.

*Palabras clave:* vaca lechera, métodos de muestreo, líquido ruminal, microbioma, metagenómica

## Abstract

The quest to improve the efficiency and sustainability of dairy production has led to research into the complex ruminal microbiome system, and in this context, the extraction of ruminal fluid samples is a critical step. The standard method for extraction is through the ruminal fistula, which offers accurate sampling but raises methodological questions regarding animal welfare and makes it more difficult to perform mass sampling, as it involves surgery in the flank area. As an alternative, the oro-ruminal probe is a less invasive and more practical method for obtaining multiple samples. The objective of this study was to compare the use of the oro-ruminal probe versus the ruminal fistula as a sampling methodology to characterize the prokaryotic microbial community of the rumen in primiparous Holstein cows during the transition period, evaluating similarities and differences in microbial composition and structure at three time points around calving (-30, +35, and +65 days). Nine Holstein-American heifers cannulated at the rumen level underwent ruminal fluid extraction using both methods at the three time points around calving. Samples were taken in the morning when the animals were fasting. Each sample was placed in a sterile, labeled 50 ml tube. These samples were centrifuged at 10,000 rpm, 4°C, for 10 minutes, and the sedimented material was extracted using sterile pipettes, transferring it to two sterile, properly labeled 2 ml bottles. These small vials are the sample from which the microbial population was evaluated and were stored at -80°C. The microbial population of each sample was detected by amplifying the variable regions V3-V4 of the 16S gene and paired-end sequencing with the Illumina MiSeq platform. The objective was to group the sequences at the ASV (Amplicon Sequence Variants) level to characterize the taxonomic groups at the microbial genus level using the public Silva database (version 138.2). The DADA2 package of the R statistical software (version 4.3.1) was used for statistical analysis. Rarefaction curves showed that the sequencing depth was adequate. The richness and diversity of ASVs and microbial genera did not show significant differences between sampling methods ( $p > 0.05$ ). The mean Pearson and Spearman correlations according to sampling time for the relative abundances of microbial genera using fistula and probe were high ( $r > 0.7$ ) but decreased from prepartum to postpartum. Differential expression analysis showed that none of the evaluated genera presented differences between methods ( $\text{padj} > 0.05$ ). The %CV of relative abundances of genera between sampling methods increased according to sampling time, from 8.7% at time -30 to 15.4% at time +35, and 26.6% at time +65. On average, the probe shared 85.8% of the central genera detected by the fistula extraction method. Therefore, the use of the oro-ruminal probe was able to characterize and provide a good biological signal about the microorganisms in the

ruminal fluid, which suggests that it is a reliable alternative for evaluating the ruminal environment.

*Keywords:* dairy cow, sampling methods, ruminal fluid, microbiome, metagenomics

## 1. Introducción

La producción lechera en Uruguay ha ido en aumento, impulsada tanto por mayor producción individual (litros/vaca/día) como por una mayor carga animal en los sistemas (vacas/ha), con una intensificación que se ha basado en un significativo incremento en el uso de concentrados (cereales y subproductos de la industria) y reservas forrajeras (Oficina de Estadísticas Agropecuarias [DIEA], 2009, 2025).

El almidón, componente principal de estos productos, presentan alta fermentación en el retículo-rumen (60–95%), sobre todo cuando se reduce el tamaño de partícula del grano mediante algún proceso mecánico que favorecen el acceso microbiano al endosperma, determinando cuánto es lo que se degrada en rumen y cuanto pasa al intestino (Armstrong & Smithard, 1979). Sin embargo, altos niveles de inclusión de cereales pueden reducir el pH ruminal al aumentar la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), modificando e incluso afectando negativamente la población microbiana ruminal (como los procariotas que incluyen bacterias y arqueas), lo que podría incrementar el riesgo de trastornos metabólicos (Blanco, 1999; Penner et al., 2009).

El microbioma ruminal es fundamental en la vaca ya que participa en la degradación de la fibra, la fermentación de carbohidratos y la síntesis de proteína microbiana, esenciales para la nutrición y la salud del animal (Khafipour et al., 2016; Moraïs & Mizrahi, 2019). El perfil y la diversidad de microorganismos impactan directamente sobre la digestibilidad, la eficiencia productiva, y performance animal, la susceptibilidad a trastornos metabólicos, e incluso sobre las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) (Kong et al., 2025; Zhao et al., 2024).

El periodo de transición, que abarca aproximadamente tres semanas antes hasta tres semanas después del parto, es una etapa crítica ya que la vaca atraviesa importantes cambios fisiológicos y nutricionales que repercuten en el microbioma ruminal (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine [NASEM], 2021). La reducción en la ingesta, la movilización de reservas corporales y las variaciones hormonales generan un balance energético negativo (BEN) que puede afectar la estabilidad de las comunidades microbianas (Kong et al., 2025; Meikle et al., 2013), donde las categorías jóvenes (vaquillonas de primer parto) presentan mayor susceptibilidad debido a que aún están finalizando su desarrollo pleno. Además, el cambio hacia dietas con mayor proporción de concentrados modifica la composición microbiana, favoreciendo géneros asociados a la fermentación amilolítica y la producción de propionato (Henderson et al., 2015).

Por razones como estas, caracterizar el perfil y la dinámica microbiana, así como mejorar la comprensión de lo que significa un microbioma benéfico, es fundamental para mejorar la eficiencia nutricional y la sustentabilidad de la producción, buscando modular el perfil microbiano mediante la alimentación y uso de aditivos (Calsamiglia et al., 2005; Perez et al., 2024). En este sentido, la extracción de muestras de líquido ruminal es un paso crucial en la determinación del microbioma ruminal. El método tradicional de extracción (por medio de fístula ruminal), aunque permite un buen muestreo gracias a la certidumbre a la hora de decidir en qué lugar tomar la muestra, implica un cuestionamiento metodológico ante el bienestar animal y mayor dificultad de realizar muestreos masivos, ya que implica una cirugía a nivel del hueso del ijar (Nan, 2002). Como alternativa, la sonda oro-ruminal se presenta como un método menos invasivo y más práctico para obtener múltiples muestras (Geishauser, 1993), aunque su representatividad del perfil microbiano requiere ser evaluado (Ramos-Morales et al., 2013). Comparar ambos métodos permitirá determinar si la sonda oro-ruminal, es una alternativa viable para el estudio masivo de las comunidades microbianas ruminales, determinadas a partir de la secuenciación del gen 16S el cual logra detectar los diversos tipos de bacterias e incluso arqueas.

Bajo este marco, la hipótesis de este trabajo es que el muestreo por sonda oro-ruminal es una alternativa viable, sencilla para caracterizar la diversidad microbiana procariota, sin diferencias significativas respecto al muestreo por fístula.

El objetivo general es comparar el uso de sonda oro-ruminal frente a la fístula ruminal como metodología de muestreo para caracterizar la comunidad microbiana procariota del rumen en vacas Holando primíparas durante el periodo de transición, evaluando similitudes y diferencias en la composición y estructura microbiana en tres momentos alrededor del parto (-30, +35 y +65 días), contemplando que el método alternativo favorece el bienestar animal. El objetivo específico es comparar esas comunidades microbianas utilizando la secuenciación del gen 16S.

Este estudio contribuirá a validar un método de muestreo de líquido ruminal alternativo, en concordancia con prácticas a favor del bienestar animal, para futuras aplicaciones científicas e incluso comerciales. Generará la posibilidad de ampliar el conocimiento sobre el microbioma ruminal durante la transición, fortaleciendo la comprensión de los procesos nutricionales y metabólicos en sistemas lecheros. Además, podría brindar información para investigaciones orientadas a la mitigación de emisiones de GEI.



## 2. Revisión Bibliográfica

### 2.1 Características globales del sector

La producción lechera en Uruguay ocupa 623.000 hectáreas (ha) que corresponden al 3,8% de la superficie agropecuaria con una remisión de leche a plantas de 2.037 millones de litros para el año 2024 (DIEA, 2025).

Para el año 2024 existen 2978 productores lecheros comerciales donde aproximadamente el 70% trabaja sobre menos de 200 ha (DIEA, 2025). El sistema de alimentación se basa en pastoreo directo y suplementación con concentrados y reservas forrajeras, con 209 mil hectáreas de nuevas praderas, con un 61% de pasturas mejoradas del total del área lechera (DIEA, 2025).

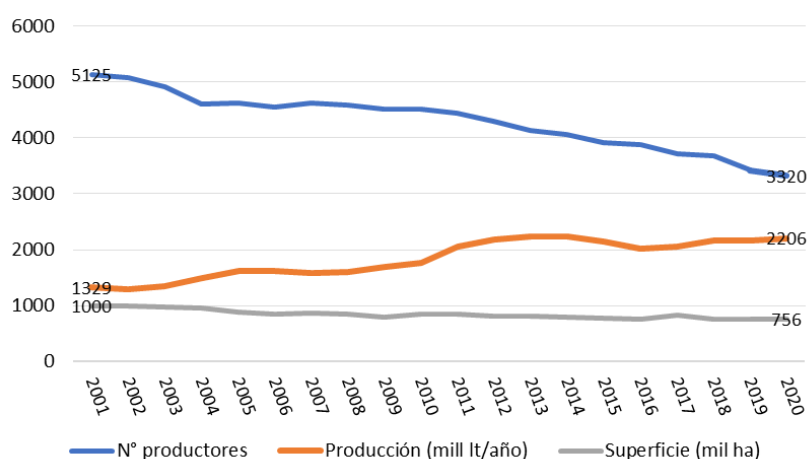
### 2.2 La producción lechera en Uruguay

#### 2.2.1 Evolución

Desde comienzo de siglo a la actualidad, se ha dado un proceso de incremento en la producción de leche y una disminución en el número de establecimientos. En cuanto a la superficie lechera, la misma se ha reducido en un 24,4% con relación al año 2001 (Figura 1).

**Figura 1**

*Evolución de número de productores, producción anual y superficie explotada en el período 2001-2020*



*Nota.* Elaborado en base a DIEA (2011, 2017, 2021).

El aumento en la producción, a pesar de la caída en número de establecimientos y superficie lechera, se puede explicar por dos factores: aumento en la producción individual

(l/VO/día), y aumento en la carga animal (cabezas/ha), esta última a través de un crecimiento de tamaño de rodeo y mayor eficiencia reproductiva, es decir, más vacas en ordeño (VO) en relación con vaca seca (VS) (DIEA, 2025).

### 2.2.2 Caracterización de los sistemas de producción

Son diversas las dimensiones y tipos de sistemas productivos. Según DIEA (2025) en promedio los tambos poseen 128 Vaca Masa (VM) y una relación VO/VM de 0,77. La producción de leche para el periodo 2023 a 2024 fue de 5865 l/año/VM, con una producción individual de 20,9 l/VO/día.

Fariña y Chilibraste (2019), entre los años 2013 a 2017 caracterizaron 256 tambos participantes del Proyecto de Producción Competitiva de Conaprole (PPC), y los clasificaron en cuatro grupos de acuerdo con su tasa de crecimiento anual medida como leche total producida: alto decrecimiento (-9,4% anual); medio decrecimiento (-2% anual); medio crecimiento (+2,3% anual); alto crecimiento (+7,2% anual).

**Tabla 1**

*Caracterización de tambos del Proyecto de Producción Competitiva de Conaprole (PPC) entre 2013 a 2017*

VARIABLES	AD	MD	MC	AC
Sólidos (kg/vaca/año)	431	467	497	504
Carga (VM/ha)	0,95c	1,15b	1,23a	1,23ab
Sólidos (kg/ha)	411c	539b	621a	327a
CMS pastura (kg/ha/año)	3264c	3757b	3967a	4916a
CMS forraje conservado (kg/ha/año)	954c	1302b	1615a	1719a
CMS concentrado (kg/ha/año)	1311c	1870b	2064ab	2096a
Precio de la leche (U\$S/l)	0,356	0,359	0,36	0,361
Costo de alimentación (U\$S/l)	0,148a	0,151a	0,144b	0,142b
Margen de alimentación (U\$S/ha/d)	2,89c	3,54b	4,14a	4,16a

*Nota.* Letras diferentes corresponden a diferencias estadísticamente significativas. AD: alto decrecimiento. MD: medio decrecimiento. MC: medio crecimiento. AC: alto crecimiento. VM: vaca masa. Adaptado de Fariña y Chilibraste (2019).

Además, estos mismos autores encontraron que el 65% de los partos están concentrados entre marzo y setiembre; el costo de alimentación delata la flexibilidad de los productores para ajustarse a los bajos precios de la leche en los años 2016 y 2017 con costos unitarios de 0,129 y 0,132 U\$S/l respectivamente; aquellos productores que estaban en crecimiento lo hicieron en parte a partir de aumentos en la producción individual y carga, cubriendo la demanda de alimentos en forma proporcional con incrementos de cantidades de

forraje pastoreado y reservas propias (además de concentrado). Otros indicadores obtenidos en el promedio de los grupos fueron: margen de alimentación 3,68 U\$S/ha/día, productividad de 550 kg de sólidos/ha, producción de leche de 470 kg de sólidos/vaca, carga de 1,14 VM/ha. Como conclusiones de este trabajo los autores proponen que existe la posibilidad de crecimiento de la producción sin perder competitividad en el mercado internacional mediante el aumento de la producción y utilización del forraje de producción propia (particularmente pastura), y la duplicación de las cargas actuales respecto al promedio. Estos caminos para el aumento de la productividad parecen tener cuatro puntos clave: mejorar la gestión del pastoreo, precisar la suplementación, trabajar sobre las restricciones de infraestructura del tambo, y dinámica del rodeo.

En cuanto a los dos primeros puntos clave (gestión del pastoreo y la suplementación), estos podrían sugerir no sólo difundir y aplicar manejos ya conocidos por su impacto positivo sobre el sistema, sino también continuar ahondando en los factores que afectan la eficiencia de la alimentación. En este sentido, la comprensión del sistema ruminal a partir del mayor entendimiento de la dinámica de su microbioma, parecen ser líneas de estudio importantes. Esto lleva a pensar en la utilización de un método de muestreo masivo que esté en concordancia con las prácticas a favor del bienestar animal, y que permita evaluar con precisión los microorganismos del rumen (como por ejemplo bacterias y arqueas).

### **2.3 Alimentación de la vaca lechera**

En la producción lechera se transforman tanto física como químicamente los tejidos vegetales y gracias a este complejo proceso, la vaca obtiene los nutrientes necesarios para sintetizar este producto de alto valor biológico. Por lo tanto, es de suma importancia comprender la fisiología digestiva de estos animales, sus requerimientos e ineficiencias, para realizar un manejo eficiente y sostenible que permita alcanzar los objetivos productivos.

La particularidad de estos animales de poder digerir material vegetal se debe a que cuentan con un aparato digestivo complejo con cuatro compartimentos (retículo, rumen, omaso y abomaso). Particularmente, el rumen guarda una relación simbiótica con una gran cantidad de microorganismos, sobre todo con bacterias, por lo que la determinación y caracterización de estas resulta importante a la hora de mejorar el manejo nutricional de los rumiantes.

Comprender los tipos y la calidad de los alimentos, junto con la fisiología y los requerimientos de los animales, permitiría interpretar con mayor precisión la dinámica y

complejidad del ecosistema ruminal, lo cual podría influir tanto en la composición microbiana como en la representatividad del método de muestreo.

### **2.3.1 Característica de los alimentos**

En cuanto a la caracterización de los alimentos, existen dos métodos muy difundidos: el método Weende y el método de Van Soest. El primero es el más antiguo, y es un conjunto de métodos analíticos que ofrecen los contenidos de humedad, proteína bruta (actualmente la PB se realiza mediante el método Kjeldagl con el cual se conoce el nitrógeno total), extracto etéreo (material graso), fibra bruta, extracto no nitrogenado, y cenizas (material mineral) (Segura Sánchez et al., 2007). Hoy en día los carbohidratos no se determinan mediante el método Weende (Segura Sánchez et al., 2007). El método Van Soest es más actual, y reemplaza la fibra cruda y el extracto libre de nitrógeno por solubles en detergente neutro (SDN) que constituyen la fracción totalmente digestible de carbohidratos y proteínas, así como lípidos y algunas cenizas; fibra detergente neutra (FDN) que representa los carbohidratos estructurales (parcialmente digestible) y la lignina (completamente indigestible); fibra detergente ácida (FDA) que aísla principalmente celulosa y lignina, pero no hemicelulosa lo que la hace inadecuada para medir la fibra estructural total, y lignina (LDA) (Segura Sánchez et al., 2007).

Los alimentos se dividen en 8 clases según sus características nutricionales: forrajes secos y alimentos toscos, forrajes frescos, forrajes ensilados, alimentos energéticos, alimentos proteicos, suplementos minerales, suplementos vitamínicos, y aditivos (National Research Council [NRC], 1996). Los forrajes deben presentar valores de FC > 18%, FDN > 32%; los energéticos deben presentar FC < 18%, FDN < 32%, FDA < 22%, PC < 20%; y los proteicos deben presentar 20% PC.

Fariña y Chilibroste (2019), mencionan que la dieta diaria promedio en kg MS/vaca en los tambos de Uruguay es de 9,5 forraje directo, 4,2 concentrado, 3,1 reservas.

#### **2.3.1.1 Forrajes**

Los sistemas productivos que dependen de la producción de forraje verde poseen grandes variaciones a lo largo del tiempo, debido no sólo a los cambios en los requerimientos animales, sino también, por la producción y calidad del forraje. Estas variaciones dependen de factores climáticos, edáficos y de manejo, siendo la producción lechera en particular, donde se hacen más visibles más rápidamente estas fluctuaciones (Carámbula, 2002).

Con el fin de cubrir los requerimientos se utilizan diferentes tipos de pasturas. En Uruguay las dos familias más utilizadas son las Poáceas (Gramíneas) y Fabáceas (Leguminosas); de hábitos de vida anual, bianuales y perennes; con ciclo productivo invernales y estivales. Las

mismas se presentan como verdeos o praderas, puras o en mezcla (Carámbula, 2002). Los distintos tejidos vegetales presentan diferente composición química determinando el grado de digestibilidad para los rumiantes (Van Soest, 1994). La lignina es un compuesto indigestible para los mismos y se concentra en la pared celular, por lo que el valor nutritivo de los forrajes está determinado por la proporción de los carbohidratos estructurales y su grado de lignificación (Buxton & Redfearn, 1997). La proporción de pared celular incrementa al aumentar la proporción de tallos, y el grado de lignificación se eleva con el incremento de temperatura y edad de las pasturas (Trujillo & Uriarte, 2015). Por lo tanto, las características anatómicas, fisiológicas y químicas de cada especie determinan su valor nutritivo potencial, la mayoría de esas características vienen expresadas en la genética de cada especie, otras se adquieren por efectos ambientales, nutricionales y de manejo (Trujillo & Uriarte, 2015).

Las leguminosas poseen hojas anchas con una función básicamente metabólica y están unidas al tallo por un pecíolo, mientras que las gramíneas presentan hojas alargadas con una marcada nervadura central (generalmente lignificada) generando estructura y envolviendo al tallo por encima del nudo (Trujillo & Uriarte, 2015).

Las características de invasión son diferentes entre gramíneas y leguminosas, siendo paraleliforme y reticulada respectivamente, confiriendo a las leguminosas una menor resistencia al quiebre durante la ingesta y rumia, lo que sumado a una mayor facilidad de degradación de la fibra en estas especies forrajeras determina un menor tamaño de partícula (Carámbula, 2002; Kammes & Allen, 2012). En términos generales, a medida que disminuye el tamaño de partícula, el ataque microbiano se ve favorecido y aumenta la tasa de pasaje; esto es beneficioso, sin embargo, un tamaño de partícula muy pequeño determina una ineficiencia en la fermentación microbiana por una excesiva tasa de pasaje (Wilson & Mertens, 1995).

La correcta actividad ruminal es esencial para lograr la máxima utilización de la energía contenida en la fracción potencialmente degradable de los forrajes y la máxima producción de proteína microbiana. Dado que gran parte de esa actividad ruminal está determinada por las características químicas de la pastura, se presenta a continuación un resumen de las principales familias utilizadas en el Uruguay.

**Tabla 2**

*Resumen de información nacional de composición química de gramíneas y leguminosas*

Composición Química (%)	Pasturas	
	Gramíneas	Leguminosas
MS	25,1 (19,75- 30,5)	26,8 (21,2 - 30)
PC	14.6 (6,28-18,9)	22.6 (20,2- 25,7)
FDN	54.9 (52,1 - 60,4)	45.7 (44,5 - 47,3)
LDA	2.88 (1,4 - 3,05)	8.5 (6,7 - 10,35)

*Nota.* Valores expresados en base seca. MS: materia seca. PC: proteína cruda. FDN: fibra de detergente neutro. LDA: fibra detergente ácida. Marichal y col., inédito (como se cita en Trujillo & Uriarte, 2015).

Una de las principales características que diferencian a las gramíneas de las leguminosas es su nivel de PC (proteína cruda), siendo considerablemente mayor en estas últimas. Las gramíneas son fuente importante de energía (de concentración variable) debido a su aporte en FDN (Trujillo & Uriarte, 2015)

Dadas las características anatómicas y químicas: en términos generales, las especies templadas tienen mayor valor nutritivo que las tropicales, presentando mayores valores de digestibilidad y consumo voluntario, así como mayores tenores de PC y otros nutrientes como minerales (principalmente fósforo) (Trujillo & Uriarte, 2015).

Las principales especies utilizadas en el país: Avena (*Avena sativa*), Raigrás (*Lolium multiflorum*), Dactylis (*Dactylis glomerata*), Festuca (*Festuca arundinacea*), Sudangrass (*Sorghum drummondii*), Sorgo forrajero (*Sorghum spp.*), Alfalfa (*Medicago sativa*), Trébol Blanco (*Trifolium repens*), Trébol Rojo (*Trifolium pratense*), Lotus corniculatus (*L. corniculatus*) y Achicoria (*Cichorium intybus*) (Berretta, 2003).

Una estrategia utilizada es el diferimiento de forraje mediante la confección de reservas. Existen diversos tipos y siempre son de menor calidad que el forraje fresco (Cattani, 2011):

Henos: el forraje es cortado y se deja secar, presentando de 10 a 15% de humedad. Tienen 10 a 20% menos de digestibilidad y proteína que el forraje original (Cattani, 2011).

Ensilajes: el forraje es cortado y luego sometido a condiciones de anaerobiosis donde ocurren procesos de fermentación. Las diferencias con el material fresco son menores, dependiendo su calidad de contenido de agua, glúcidos, tamaño del picado, uso de aditivos

(ejemplo: melaza). Dentro de los ensilajes se pueden encontrar diferentes contenidos de humedad: ensilajes de heno (Henolajes), henilajes (30 a 60% de humedad), premarchito (60 a 70% de humedad), directo (80 a 85% de humedad) (Aragón Sierra, 1998).

Según la cartilla N°4 (Cooperativa Nacional de Productores de Leche [Conaprole], 2009), el ensilaje de maíz planta entera posee: 32% MS; 7,5% PC; 54% FDN, 33% FDA; 1,45 ENL; el heno de alfalfa: 88,5 % MS; 14,5% PC; 53 %FDN: 41 % FDA; 1,25ENL; la paja de cebada: 91,5% MS, 4,3 % PC; 80 % FDN; 59 %FDA; 1,08 ENL.

El ensilaje de maíz posee un alto contenido de fibra aportando proporcionalmente más energía que proteína (pero no es un concentrado energético).

El heno de alfalfa ofrece un alto aporte de proteína que otros henos.

El heno de paja de cebada se utiliza para brindar alto contenido de fibra (FDN) y fibra efectiva.

La fibra efectiva es aquella que realmente estimula la rumia y posee un tamaño de partícula mayor a 2 cm. Depende de dos factores principales del alimento que son el largo de la partícula y el porcentaje de materia seca. Esto explica que, para un mismo cultivo y porcentaje de FDN, la fibra efectiva pueda ser diferente (Heinrichs, 2002). En vacas lecheras de lactancia temprana se debería apuntar a los siguientes tamaños de partícula en la RTM (Ración Totalmente Mezclada): 2 a 8% de las partículas con tamaños mayores a 2 cm, 30 a 50% deberían presentar de 0,8 a 2 cm, 30 a 50% deberían estar en tamaños entre 0,2 a 0,8 cm, menos del 20% con fracciones aún más pequeñas (Heinrichs, 2002).

### **2.3.1.2 Concentrados**

Los alimentos con menos de 20% de PC y menos de 18%de FC (fibra cruda) o menos de 35% de pared celular son energéticos (como granos de maíz y sorgo), y aquellos con 20% o más de PC son proteicos (como harina de soja, harina de carne, expeler de girasol) (Mieres, 2004). Son alimentos de poco volumen, pero alto contenido de proteína y/o energía.

La característica química de la harina de soja (H.S) es: MS 88 %; PC 45,5%; FDN 11%; FDA 6,4%; ENL 1,8 (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal [FEDNA], 2021).

Según Mieres (2004), las características químicas de afrechillo de trigo (A.T), grano de cebada (G.C), y grano de maíz (G.M) son:

A.T: MS 89,5%; PC 17,2%; DMO: 75,0%; FDN: 35,5%; FDA: 12,8; ENL: 1,72

G.C: MS 89,6%; PC 11,8%; DMO: 81,0%; FDN: 27,8%; FDA: 9,1; ENL: 1,86

G.M: MS 87,8%; PC 9,2%; DMO: 82,2%; FDN: 21,6%; FDA: 6,5; ENL: 1,96

\* DMO (digestibilidad de la materia orgánica).

### 2.3.1.3 Aditivos

La simbiosis entre los microorganismos y el rumiante genera ineficiencias energéticas y proteicas. Desde el punto de vista energético principalmente referidas a la producción de metano, mientras que las ineficiencias proteicas refieren a pérdidas de nitrógeno amoniacal. Con el fin de reducirlas, se utilizan aditivos en la dieta, generando un aumento en la producción animal y una disminución de salidas del sistema de sustancias ambientalmente contaminantes.

La posibilidad para modular la fermentación ruminal puede realizarse mediante el uso de aditivos para estimular el crecimiento de ciertas bacterias, como los aditivos microbianos y los ácidos orgánicos; y aditivos que buscan desestimular otro tipo de bacterias, como los extractos de plantas y los ionóforos (Calsamiglia et al., 2005).

Aunque no sean el objetivo de estudio en particular, este trabajo se enmarca en un estudio donde los aditivos son una variable de análisis, ya que los animales de experimentación fueron sometidos a tratamientos con monensina (ionóforo carboxílico) y aceites esenciales.

El éxito de los ionóforos carboxílicos en la modulación microbiana se basa en su capacidad de agotar la energía que posee la bacteria para su metabolismo y crecimiento. La actividad bioquímica de este aditivo induce la salida de potasio ( $K^+$ ) desde el citoplasma celular, modificando el gradiente catiónico y protónico y, por lo tanto, logrando un desequilibrio ácido-base. Como mecanismo de compensación para elevar el pH citoplasmático, la célula comienza a liberar  $H^+$  hacia el exterior, pero este proceso incurre en un altísimo costo energético (Russell, 1987, como se cita en Pinos Rodríguez & González Muñoz, 2000).

La monensina inhibe básicamente bacterias gram positivas productoras de lactato, como pueden ser *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Eubacterium cellulosolvens*, *E. ruminantium*, *Lachnospira multiparus*, *Lactobacillus ruminis*, *L. vitulinus*, *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens*, *Streptococcus bobis* (Dennis et al., 1981), pero no tienen efecto sobre *Megasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium*. Además de lactato, las bacterias Gram positivas generalmente presentan perfiles de fermentación que dan como producto acetato, butirato e, hidrogenión ( $H^+$ ). El control de estos microorganismos mejora la utilización de la energía debido al aumento en la cantidad y proporción de propiónico, disminución de acético, y a la reducción en la producción de metano. Esto desestimula a las bacterias metanogénicas, ya que la baja disponibilidad de  $H^+$  no permite utilizarlo como reductor del dióxido de carbono para producir metano (Henderson et al., 1981, como se cita en Pinos Rodríguez & González Muñoz, 2000),



dándose a su vez una caída de la relación NAD/NADH por la baja concentración de  $H^+$ , lo cual desestimula la oxidación de aminoácidos y la proteólisis.

Por lo tanto, este aditivo actúa sobre tres aspectos de la fermentación a nivel ruminal: mejora la utilización de la energía consumida debido a que aumenta la producción de propionato y disminuye la formación de metano; el metabolismo proteico se ve mejorado gracias a una reducción en la degradación de la proteína y de la desaminación de los aminoácidos; y disminuye la probabilidad de acidosis y empaste dada una reducción tanto de la producción de ácido láctico como de la formación de espuma (Bergen & Bates, 1984, como se cita en Colombatto, s.f.).

El uso de estos antibióticos ha perdido aceptación por la posible presencia de residuos y resistencias bacterianas cruzadas causantes de patologías en humanos.

Los extractos de plantas pueden sustituir el uso de monensina. La actividad antimicrobiana de estos se atribuye al contenido de, por ejemplo: saponinas, taninos, aceites esenciales. Los aceites esenciales no presentan un único mecanismo de acción, y algunos reducen la metanogénesis, mejorando la eficiencia en la utilización de los nutrientes (Calsamiglia et al., 2005).

Los aceites esenciales están compuestos aproximadamente de un 90% por monoterpenoides, y en menor medida por terpenoides y fenilterpenoides (Bodas et al., 2012, como se cita en Chávez-Soto et al., 2021). Controlan bacterias gram positivas y gram negativas debido a su capacidad de lisar la membrana citoplasmática, gracias a que son moléculas lipofílicas (Dorman & Deans, 2000, Griffin et al., 1999, Sikkema et al., 1994, Ultee et al., 1999, como se cita en Calsamiglia et al., 2005).

### **2.3.2 Requerimientos nutricionales de la vaca**

El componente de requerimientos se divide en: mantenimiento, crecimiento, lactancia y preñez. Por otro lado, los requerimientos son planteados de manera diferente para cuatro grupos de animales: vacas lactantes, vacas secas, vaquillonas de reemplazo, animales jóvenes (NRC, 2001).

Los nutrientes en los que se hace mayor énfasis son la energía y la proteína: la energía neta de lactación (ENL) es la forma en que se expresan los requerimientos energéticos para mantenimiento y producción de leche. La proteína metabolizable (PM) es la forma en que se expresan los requerimientos de proteína, y refiere a la proteína que es verdaderamente digerida luego de la rumia y los aminoácidos que son absorbidos por el intestino (NRC, 2001). La proteína de mantenimiento es aquella que es necesaria reponer debido a pérdidas por descamaciones

de la piel, urinarias, metabólicas y endógenas; mientras que la proteína para lactancia (PMLact) es aquella que es requerida debido a la cantidad de proteína secretada en la leche y la eficiencia con que se utiliza la PM en lactancia (NRC, 2001).

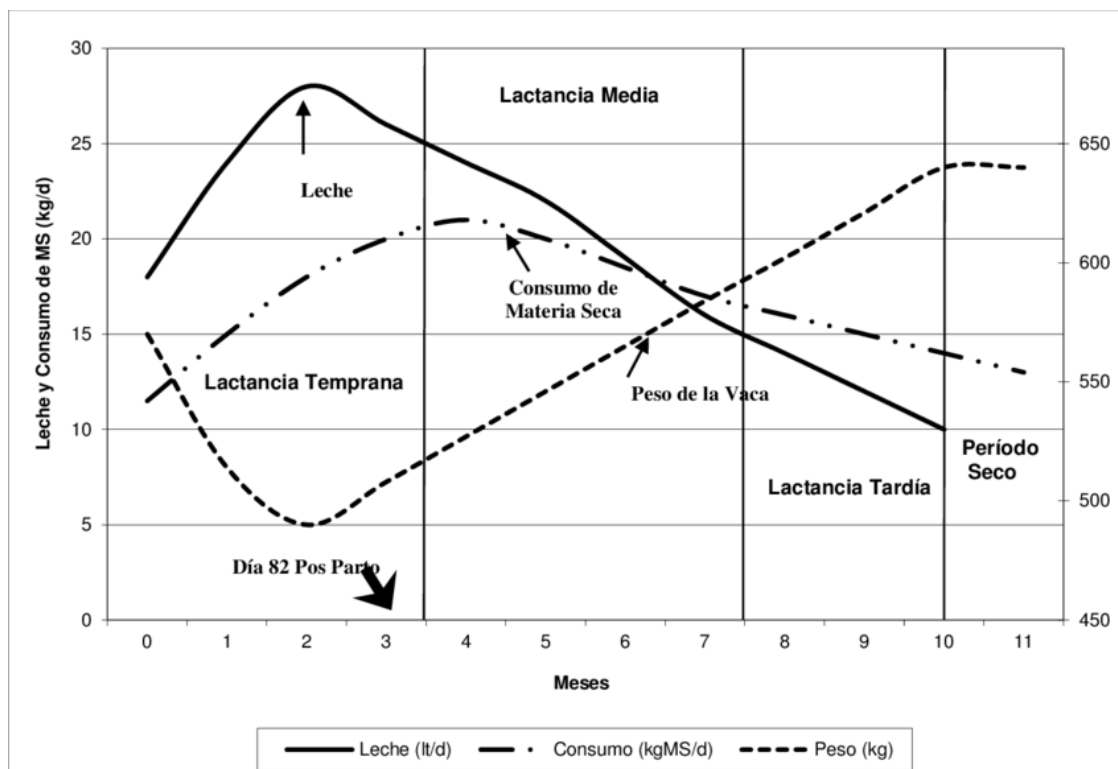
La proteína metabolizable de origen bacterial (PMBact) que es sintetizada en rumen, representa del 50 al 80% del total absorbible (Storm & Ørskov, 1983, como se cita en Bach et al., 2005), es de alto valor biológico, y presenta una elevada digestibilidad (en torno al 80%). Para la síntesis de proteína microbiana es de vital importancia el balance entre la energía y la proteína ofrecida: una dieta alta en energía y baja en proteína conlleva a que los microorganismos utilicen el nitrógeno proveniente de la circulación sanguínea para formar su proteína, y de forma contraria, dada una dieta baja en energía y alta en proteína determina que los microorganismos desaminen la proteína en exceso (tratan de cubrir los requerimientos energéticos utilizando los esqueletos carbonados) generando que el grupo amino libre derive al hígado y se sintetice urea. Según NRC (2001), la PMBact es calculada bajo dos condiciones: cuando la energía de la dieta es limitante para el crecimiento microbiano y cuando el limitante es la proteína degradable en el rumen (PDR). En el primer caso se estima que la síntesis de PMBact equivale a 130 gr por cada kg de nutrientes digestibles totales (NDT) y, en el segundo caso, se estima que esta es equivalente a 850 gr por cada kg de PDR.

Los requerimientos nutricionales de la vaca lechera varían según diversos factores: edad, tamaño, peso, estado fisiológico, nivel de producción. Además, los requerimientos son marcadamente diferentes según el sistema de producción: animales estabulados, semi estabulados, libres a pastoreo; estas diferencias se deben básicamente a cambios en los requerimientos de mantenimiento, ya que, al pasar de un sistema libre a pastoreo a un sistema estabulado, estos disminuyen debido a que los requerimientos de actividad (caminata y pastoreo) decrecen.

El ciclo productivo de la vaca lechera está dado, en teoría, por un parto por año, con una duración de la lactancia de 305 días y un período seco de 60 días. Según Wood (1967), en su estimación de la curva de producción, la lactancia puede dividirse por tercios, donde el pico de producción de leche se da aproximadamente a la sexta semana post parto (primer tercio), seguido de un descenso paulatino hasta los 10 meses donde comienza el periodo seco.

**Figura 2**

*Producción, consumo y peso de vacas lecheras a lo largo de la lactancia*



*Nota.* Tomado de Acosta (2002).

Conocer este ciclo es de suma importancia para el entendimiento de los requerimientos y el manejo nutricional. Una de las principales diferencias que se da entre el preparto y el posparto es que en este periodo de transición la dieta debe pasar de poseer alta concentración de forraje y fibra a poseer mayores concentraciones de almidón y proteína, lo que además de aumentar el consumo de materia seca, también aumenta las concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGV) ruminales (NASEM, 2021). Las etapas en el ciclo podrían dividirse en forma esquemática utilizando una escala de tiempo en semanas (respecto al parto, siendo este el momento cero) para obtener un ternero por vaca por año:

- Vaca en transición (preparto, parto, postparto): -3 a +3 semanas entorno al parto. La función fisiológica específica de este momento se basa en los cambios metabólicos a nivel de órganos y tejidos, donde, por ejemplo, las papilas ruminales aumentan su tamaño para mejorar la absorción de ácidos grasos volátiles (AGV) (Bauman & Currie, 1980). Existe una alta demanda nutricional por producción de leche y una disminución de 30% a 35% del consumo previo al parto, lo cual promueve la movilización de reservas corporales generándose un balance energético negativo (BEN) que se agrava en las semanas próximas al parto (Grummer, 1995).

Como se observa en la Figura 2 luego del parto, el consumo comienza a aumentar a una tasa menor que los aumentos de requerimientos de producción de leche, generando así el BEN, determinando la pérdida de condición corporal (CC) en la vaca. Este periodo es de particular relevancia, ya que se presentan cambios muy importantes, tanto físicos como fisiológicos, por lo que la nutrición debe responder a estos cambios mediante la oferta de un alimento preparto y postparto. Estos cambios se dan a nivel metabólico (cambios intrínsecos al animal y cambios externos como la alimentación), donde el sistema digestivo adapta la pared y la flora ruminal (pasa de ser celulolítica a ser amilolítica), dándose un cambio en la absorción de ácidos grasos volátiles (AGV).

- Lactancia temprana (semana 0 a +12): en este periodo se alcanza el pico de producción de leche en torno a la +6 semanas (luego disminuye hasta el comienzo del periodo seco). Si bien el consumo continúa aumentando, el balance energético es negativo hasta el fin de esta etapa (McGuire et al., 2004; Wood, 1967).

- Lactancia media (semana +12 a +28): se da la meseta de consumo a comienzos de esta etapa (máximo consumo) favoreciendo el final del BEN y donde comienza la recuperación de la CC. Este es un periodo clave para obtener las reservas corporales necesarias y lograr la preñez (NRC, 2001; Roche et al., 2009).

- Lactancia tardía (semana +28 a +38): el consumo comienza a disminuir y a aumentar los requerimientos de gestación. El peso de la vaca continúa en aumento debido a que continúa mejorando su condición corporal y, principalmente por el aumento de peso del ternero (Bell, 1995; NRC, 2001).

- Periodo seco (semana +38 hasta el inicio de la nueva lactancia): a medida que se aproxima el final de la gestación el consumo decrece hasta el parto, los requerimientos de nutrientes del feto pasan a ser gravitantes en la demanda total de nutrientes, siendo una etapa crítica para maximizar la producción de leche en las dos lactancias que siguen (Días & Allaire, 1982; NRC, 2001).

## **2.4 Generalidades sobre el ambiente y la comunidad microbiana del rumen**

El rumen es un saco con muy baja concentración de oxígeno y temperaturas que rondan entre los 39 a 42°C, y un pH que puede aproximarse entre 6,0 a 7,0.

Según Van Soest (1994), el ambiente ruminal “óptimo” presenta las siguientes características: pH 6,7 a 6,8;  $\text{NH}_3$  5 a 8 mg/dl; AGV 75 a 90 mMol/l; ratio A/P (Acético/Propiónico) de 6,5/1.

Ya que los mamíferos carecen de las enzimas propias necesarias para degradar alimentos fibrosos, el éxito de los rumiantes se debe a una simbiosis con microorganismos que habitan el rumen: el animal proporciona un hábitat y nutrientes, mientras que los microorganismos fermentan los alimentos que el animal no puede.

En condiciones naturales, un rumiante joven sigue ingiriendo leche durante varios meses, además de pequeños trozos de vegetación de su entorno. Estos ingresan al rumen junto con algo de leche y se convierten en sustratos para los microorganismos que, al igual que la flora intestinal, se desarrollan después del nacimiento a partir de la contaminación desde la madre y el entorno (Hobson & Stewart, 1997).

Los microorganismos hidrolizan las celulosas, hemicelulosas, pectinas, fructosanos, almidones y otros polisacáridos de las plantas a azúcares monoméricos o diméricos que se fermentan, junto con cualquier azúcar simple de la vegetación, para dar varios productos, algunos de los cuales pueden estar sujetos a una acción microbiana adicional. Los productos finales de las acciones microbianas producidos por consorcios de bacterias, protozoos y hongos, son principalmente: ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, metano y dióxido de carbono (Hobson & Stewart, 1997). Esto los caracteriza como los únicos mamíferos capaces de aprovechar muy bien los alimentos de altos contenidos de celulosa.

La diversidad de microorganismos del rumen es importante porque la presencia de especies distintas aporta un conjunto mayor de genes y complemento de enzimas, así como reacciones bioquímicas precisas para una conversión máxima de productos alimenticios en células microbianas y productos de fermentación. Existen en el rumen especies que se superponen en su capacidad para utilizar un determinado sustrato aumentando así la eficacia con que es utilizado dicho sustrato. Una población diversa estabilizará la fermentación, al evitar grandes fluctuaciones en las cantidades y proporciones de productos finales formados (Blanco, 1999).

La velocidad a la que estos microorganismos realizan la fermentación depende de dos grandes factores que son la tasa de consumo y las características fisicoquímicas del alimento. Aquellos alimentos que poseen mayor cantidad de azúcares y proteínas solubles serán de más rápida digestión, seguidos por el almidón (dependiendo de su solubilidad), y por último los carbohidratos de la pared celular (celulosa y hemicelulosa) (Kozloski, 2017).

El ecosistema ruminal está compuesto por bacterias ( $10^{10}$  a  $10^{11}$  células/ml, representando más de 50 géneros), arqueas ( $10^7$  a  $10^9$  células/ml), protozoos ciliados ( $10^4$  a

$10^6$ /ml, con 25 géneros), hongos anaerobios ( $10^3$  a  $10^5$  zoosporas/ml, representando más de 5 géneros) y bacteriófagos ( $10^8$  a  $10^9$ /ml) (Kamra, 2005).

En general, se ha encontrado que la dieta, más que la ubicación geográfica o incluso la especie de rumiante, es el principal determinante de los tipos y números de los microorganismos predominantes en el rumen y de sus funciones en el animal adulto (Hobson & Stewart, 1997).

Las bacterias normalmente constituyen la mayor parte de la biomasa microbiana ruminal (60% a 90%), son los fermentadores más activos, más estudiados y considerados los más importantes nutricionalmente (Kozloski, 2017).

## **2.5 La importancia del periodo de transición y su relación con los microorganismos**

### **procariotas del rumen**

Además de los parámetros fisicoquímicos deseados y de la salud del epitelio ruminal que procura la absorción y metabolismo de nutrientes, un rumen sano también se caracteriza por una alta riqueza, diversidad, estabilidad y actividad de sus microorganismos (Khafipour et al., 2016). Géneros de bacterias como *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, y *Prevotella* son de los principales digestores de fibra y son parte fundamental del microbioma central del rumen, procurando salud y buena nutrición animal (Krause et al., 2003; Morais & Mizrahi, 2019). Los cambios fisiológicos y del consumo de la vaca durante el periodo de transición impactan sobre la población de los microorganismos ruminales, y estos a su vez inciden sobre la regulación del metabolismo energético, la performance y en posibles enfermedades metabólicas (Kong et al., 2025; Zhao et al., 2024).

Se sabe que la vaca experimenta importantes cambios fisiológicos durante el periodo de transición, en los que el estado endócrino, junto con la reducción en la ingesta de alimento, modifican el metabolismo y favorecen la movilización de las reservas de grasa corporal y del glucógeno hepático. De esta manera, el animal se adapta para afrontar el incremento de las demandas energéticas propias del posparto (NASEM, 2021).

En este mismo periodo, las concentraciones de insulina y del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) se mantienen en niveles bajos debido a una resistencia fisiológica a la insulina en los tejidos periféricos, como músculo y tejido adiposo. Este mecanismo permite que la glucosa se destine prioritariamente al desarrollo fetal y, tras el parto, a la síntesis de lactosa en la glándula mamaria (NASEM, 2021).

En la lactancia temprana, las vacas lecheras pueden perder hasta un 60% de su grasa corporal, lo que se traduce en una disminución de la condición corporal (CC). Esta pérdida suele

ser más marcada en vacas primíparas que en multíparas, lo que sugiere que habría que acentuar el seguimiento sobre las categorías jóvenes. La reducción de la CC se asocia con un aumento de los ácidos grasos no esterificados (NEFA), los cuales son metabolizados en el hígado y dan origen a cuerpos cetónicos, principalmente  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB). Por ello, la concentración de BHB en sangre refleja el grado de déficit energético que atraviesa el animal (Meikle et al., 2013). En este sentido, Kong et al. (2025) encontraron que, en vacas en cetosis, el perfil bacteriano del rumen cambia de forma importante y necesita de un mayor periodo de tiempo para recuperarse, lo que altera los genes bacterianos enfocados en el metabolismo del propionato y los aminoácidos glucogénicos.

Como consecuencia de la pérdida de la CC, disminuye la concentración de leptina, una hormona proteica sintetizada por los adipocitos cuya producción varía en función del porcentaje de grasa corporal y que actúa como un sensor de las reservas energéticas. Esta reducción de leptina constituye un mecanismo adaptativo que estimula el consumo de alimento y favorece la conservación de energía durante el posparto (Meikle et al., 2013). El aumento del consumo y el cambio de la dieta en el posparto (menos fibra y más concentrados) implican que la flora ruminal adquiera una tendencia amilolítica, donde *Prevotella*, género con una amplia variedad de sustratos (fibra, polisacáridos, proteína, almidón) y que se encuentra en alta proporción incluso en el periodo seco, cobra importancia tanto en su abundancia como también en la producción de propionato y en la performance animal (Henderson et al., 2015).

Otro cambio que ocurre durante el periodo de transición y a medida que aumentan los días de lactancia, es el desarrollo del epitelio ruminal, donde aumenta el tamaño, cambia su morfología y su funcionalidad (NASEM, 2021). El aumento en los niveles de butirato y propionato producidos durante la fermentación bacteriana al aumentar las proporciones de concentrados en la dieta, pueden promover el crecimiento del epitelio ruminal a partir de la acción indirecta de hormonas como la insulina, el factor de crecimiento epidérmico y el IGF-1 (Diao et al., 2019), sin embargo, el efecto sobre la morfofisiología del epitelio ruminal por una alimentación con mayor proporción de concentrado no es evidente ya que autores como Andersen et al. (1999) encontraron que con una dieta alta o baja en forraje, las vacas en transición no presentaron diferencia en la morfología y desarrollo del epitelio ruminal.

Se han encontrado estudios que indican que, entre una semana preparto y diez días posparto, la masa del tejido del rumen aumentó alrededor de un 5% y siguió aumentando durante 120 días después del parto, sin embargo, con este aumento de la masa, el volumen total del rumen no varió (NASEM, 2021). Por lo tanto, estos cambios morfofisiológicos del epitelio ruminal no sólo se deben a un cambio en el estado fisiológico de la vaca, sino también a la

interacción con la variación en el perfil microbiano del rumen durante la etapa de transición. A su vez, los propios microorganismos podrían estar sujetos a las condiciones creadas en el rumen como resultado de las características de la absorción ruminal, que es dependiente del grado de desarrollo del epitelio, ya que el nivel de absorción determinará las concentraciones de AGV y los valores de pH principalmente, alterando el microbioma (Penner et al., 2009; Steele et al., 2009).

Por otro lado, las Arqueas metanógenas como *Methanobrevibacter*, si bien no son bacterias, han cobrado importancia por el impacto negativo global debido a la producción de metano que contribuye al calentamiento global y a la pérdida de eficiencia nutricional a nivel del rumiante, por lo que conocer y modular su abundancia es clave en la mejora de la sustentabilidad ganadera (Zhao et al., 2024).

## 2.6 Las bacterias ruminales

Dentro de los procariotas del rumen, las bacterias son microorganismos de gran importancia en la nutrición. El ambiente ruminal es muy dinámico y diverso, existiendo un amplio número de especies bacterianas con diferentes interacciones y características.

La localización y función principal en el rumen de estas bacterias es diversa, están libres en el líquido ruminal (principalmente para la degradación de compuestos solubles, azúcares simples, y nitrógeno soluble), adheridas a las partículas de alimento (principalmente para la degradación de carbohidratos estructurales) y, adheridas en la superficie de las células epiteliales (esta comunidad es particularmente diferente a las de la fase sólida y líquida y se asocian con la fermentación de AGV, consumo de oxígeno, hidrólisis de urea, y reciclaje de nitrógeno y tejidos) lo que podría dificultar la toma de muestras representativas del rumen para caracterizar la población microbiana (Li et al., 2020; McCowan et al., 1978).

Las bacterias del rumen varían enormemente en su especificidad de sustrato. La mayoría utiliza monómeros u oligómeros liberados del material vegetal por hidrólisis de polímeros: almidón, pectina, celulosa, hemicelulosa y lípidos. Las bacterias hidrolizadoras de polímeros fermentan los azúcares u otros compuestos liberados por la hidrólisis; entre ellas se incluyen "especialistas" como *Ruminobacter amylophilus*, que utiliza sólo almidón o sus productos de degradación, y *Fibrobacter succinogenes*, que utiliza principalmente celulosa o sus productos (Hobson & Stewart, 1997). En cambio, las cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens* que son "generalistas" o el género *Prevotella*, pueden hidrolizar una serie de sustratos como almidón, celulosa, xilano y pectina (Hobson & Stewart, 1997). Otras bacterias, como *Selenomonas*



*ruminantium*, muestran poca capacidad para hidrolizar muchos de los polímeros, pero pueden utilizar una gama muy amplia de productos de hidrólisis (Hobson & Stewart, 1997).

Algunas bacterias del rumen están muy especializadas, como la *Oxalobacter formigenes*, que obtiene la energía de la reducción del oxalato a formiato (Dawson et al., 1980, como se cita en Hobson & Stewart, 1997).

Varias especies, entre las que se incluyen *Veillonella parvula*, *Megasphaera elsdenii* y algunas cepas de *Selenomonas ruminantium* fermentan el lactato a ácidos grasos volátiles. El acetato exógeno puede ser incorporado en butirato por *Butyrivibrio fibrisolvens* (Hobson & Stewart, 1997). Una misma bacteria puede cumplir más de una función metabólica.

Las bacterias se pueden clasificar en función de los sustratos que utilizan, los productos finales de su fermentación y el tipo de membrana celular.

El tipo de pared celular es importante en la caracterización de las bacterias. La tinción de Gram es una técnica de tinción bacteriológica desarrollada por el médico Hans Christian Gram que permite agrupar a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas (Rodríguez & Arenas, 2018). Las Gram positivas adquieren una tinción violeta, mientras que las Gram negativas adquieren una tinción roja luego de haber sido decoloradas y posteriormente teñidas con safranina (Rodríguez & Arenas, 2018). El tipo de pared celular es la clave en la diferenciación de las tinciones (Rodríguez & Arenas, 2018). Las bacterias Gram positivas poseen una gruesa pared celular, sin presencia de lipopolisacáridos, pero con presencia de ácidos lipoteicoicos y teicoicos, lo que la hace impermeable y resistente a la decoloración; mientras que las Gram negativas son antagonistas a estas, ya que su pared celular es delgada con presencia de lipopolisacáridos, pero sin presencia de ácidos lipoteicoicos y teicoicos (las lipoproteínas se pueden deshacer con la decoloración) (Rodríguez & Arenas, 2018).

Como ya se mencionó anteriormente, los ionóforos como la monensina atacan a las bacterias Gram positivas. La naturaleza hidrofóbica de los ionóforos les permite interactuar con las membranas celulares de las bacterias gram-positivas, pero su elevado peso molecular y la naturaleza hidrofílica de la membrana externa de las bacterias gram-negativas les protege de dichos efectos (Calsamiglia et al., 2005).

### **2.6.1 Principales grupos de bacterias ruminales**

Bacterias celulíticas: hidrolizan celulosa. Las especies de bacterias más importantes que degradan la celulosa son *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Bacteroides succinogenes* y *Butyrivibrio fibrisolvens* (Blanco, 1999). Estas especies aparecen con mayor frecuencia ante una alimentación con una importante contribución de forraje.

Bacterias amilolíticas: utilizan almidón como sustrato. Las principales bacterias de este grupo son *Bacteroides amylophilus*, *Streptococcus bovis*, y *Bacteroides ruminicola*. Suelen predominar en el rumen cuando se consumen dietas ricas en almidón, aunque algunas bacterias como *Bacteroides ruminicola*, parecen ser más prevalentes con dietas pobres en almidón (Blanco, 1999).

Bacterias sacarolíticas: fermentan hidratos de carbono simples. Todas las bacterias del rumen que degradan carbohidratos complejos son capaces asimismo de fermentar algunos azúcares simples (Blanco, 1999). *Ruminococcus flavefaciens* puede fermentar glucosa, aunque puede utilizar celobiosa de forma eficiente. Disponen de una enzima, celobiosa fosforilasa, que fermenta la celobiosa en lugar de la glucosa (Blanco, 1999). *Treponema bryantii* se asocia a especies celulolíticas del rumen, utiliza algunos de los azúcares y dextrinas que se liberan durante la degradación de la celulosa (Blanco, 1999). *Lactobacillus vitulinus* y *Lactobacillus ruminus*, se han identificado como fermentadores de azúcar en el rumen (Blanco, 1999). Estos fermentadores de azúcares aparecen cuando se consumen dietas ricas en cereales o forrajes jugosos que contienen elevadas concentraciones de azúcares (Blanco, 1999).

Bacterias lactolíticas: metabolizan el lactato. Las bacterias que utilizan ácidos intermedios realizan la fermentación secundaria de los productos finales de otras bacterias del rumen. El lactato puede ser fermentado hasta acetato, propionato o ácidos grasos de cadena más larga por bacterias tales como *Megasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium*. El intercambio del lactato aumenta con el consumo de cereales y se produce el correspondiente aumento de bacterias que utilizan lactato (Blanco, 1999).

Bacterias lipolíticas: metabolizan las grasas. Los lípidos son metabolizados activamente por las bacterias del rumen. *Anaerovibrio lipolytica* hidroliza triglicéridos y fosfolípidos para liberar glicerina y tres ácidos grasos. La lipasa de esta bacteria es extracelular y va unida a la membrana. Galactolípidos, fosfolípidos y sulfolípidos, que se descubren en los forrajes, son hidrolizados por un *Butyrivibrio spp.* (Blanco, 1999).

Bacterias proteolíticas: degradan proteínas. Las bacterias proteolíticas del rumen incluyen *Bacteroides amylophilus*, *Bacteroides ruminicola*, algunas cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Streptococcus bovis*. Estudios practicados con inhibidores específicos indican que en el rumen aparecen al menos tres tipos de proteinasas microbianas, específicamente: cisteína-proteinasa, serina-proteinasa y metaloproteinasa. Muchas de estas especies bacterianas disponen también de exopeptidasas para una posterior descomposición de oligopéptidos hasta

aminoácidos y péptidos de cadena más corta. *Bacteroides ruminicola* precisa oligopéptidos o amoníaco para crecer (Blanco, 1999).

Por último, las arqueas metanógenas se incluyen aquí por su importancia, aunque no sean bacterias. Estas regulan la fermentación total al eliminar  $H_2$  gaseoso. La reducción de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) con hidrógeno gaseoso ( $H_2$ ) es el proceso primario por el cual se produce metano ( $CH_4$ ) en el rumen (Blanco, 1999). Esta eliminación del  $H_2$  es lo que promueve el crecimiento de otras especies para la fermentación. Las metanógenas incluyen principalmente *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum* y *Methanomicrobium mobile* (Church, 1993, como se cita en Blanco, 1999).

### **2.6.2 Principales géneros y especies de bacterias ruminales**

A continuación, se presenta una caracterización general de las principales bacterias con base a las descripciones realizadas por Hobson y Stewart (1997):

*Prevotella spp.*, conocida anteriormente como *Bacteroides ruminicola*, se encuentra en rumiantes alimentados con diversidad de dietas. Son Gram negativas estrictamente anaerobias (Hobson & Stewart, 1997). Una de las funciones son la degradación y utilización del almidón (Cotta, 1992, como se cita en Hobson & Stewart, 1997) y de polisacáridos de la pared celular. No degradan la celulosa y los productos de fermentación incluyen acetato, succinato y propionato (Hobson & Stewart, 1997).

*Bacteroides amylophilus* fue la clasificación inicial de la especie hoy conocida como *Ruminobacter amylophilus*. Es relativamente poco frecuente, pero es el principal digestor de almidón (Holdeman et al., 1984, como se cita en Hobson & Stewart, 1997), además de poseer actividad proteolítica. Los principales productos de fermentación son el acetato y el succinato (Hobson & Stewart, 1997), utilizan fundamentalmente  $CO_2$  y amoníaco para su crecimiento (Hungate, 1966, como se cita en Hobson & Stewart, 1997).

*Fibrobacter succinogenes* es de las bacterias más frecuentes a nivel ruminal (Van Gylswyk & Van der Toorn, 1986, Varel & Dehority, 1989, como se cita en Hobson & Stewart, 1997). En vacas alimentadas con paja de trigo, *F. succinogenes* constituía aproximadamente el 20% de los aislados obtenidos, mientras que en vacas con otros tipos de dietas su participación descendía a cerca del 5% de los aislados (Bryant & Burkey, 1953b, como se cita en Hobson & Stewart, 1997). Diversas investigaciones indican que algunos compuestos secundarios de origen vegetal pueden afectar a esta especie (Hobson & Stewart, 1997).

*Anaerovibrio lipolytica* se caracterizan por realizar lipólisis y utilizar lactato. Son bacterias gram negativas móviles (Prins, 1984, como se cita en Hobson & Stewart, 1997). Según

Slyter et al. (1976, como se cita en Hobson & Stewart, 1997), investigadores reportaron la detección de *A. lipolytica* al momento de pasar de una dieta a base de forrajera a una con inclusión de concentrados.

*Selenomona ruminatium* son células Gram negativas y se encuentran en animales consumiendo granos de cereales. En novillos que consumen maíz y urea pueden representar entre 20% a 50% del recuento total (Caldwell & Bryant, 1966, como se cita en Hobson & Stewart, 1997).

*Megasphaera elsdenii* son cocos Gram negativos no móviles, originalmente conocido con el nombre de *Peptostreptococcus elsdenii*. Aparece en animales jóvenes y en animales alimentados con cereales (Hobson et al., 1958, como se cita en Hobson & Stewart, 1997). Glucosa, fructuosa y lactato están asociados al crecimiento de estas bacterias y es estimulado por acetato. Para el caso de lactato, el producto principal es butirato y propionato, entre otros (Hobson & Stewart, 1997).

Ruminococcus son especies estrictamente anaerobios con estructura celular Gram positiva. Son los principales degradadores de la fibra vegetal (Bryant, 1986, Chesson et al., 1986, Dehority, 1986, Dehority & Scott, 1967, Morris, 1984, Morris & Van Gylswyk, 1980, Stewart et al., 1979, como se cita en Hobson & Stewart, 1997). Las células de Ruminococcus flavefaciens pueden presentar tinción Gram negativa o Gram variable. En el caso de *Ruminococcus albus* no todas las cepas son celulolíticas. *R. flavefaciens* tiene una gama más limitada de sustratos que *R. albus*. Los *Ruminococcus* son extremadamente sensibles al ionóforo monensina (Bryant, 1986, como se cita en Hobson & Stewart, 1997), también son sensibles a reducciones del pH ruminal (Russell & Dombrowski, 1980, como se cita en Hobson & Stewart, 1997).

*Streptococcus bovis* son Gram positivas. Presenta capacidad de rápido crecimiento, comparable en su velocidad a las tasas de crecimiento de *Escherichia coli* (Russell & Robinson, 1984, como se cita en Hobson & Stewart, 1997), y es estimulado por presencia de dióxido de carbono, además el  $\text{NH}_3$  puede ser el único sustrato utilizado para obtener nitrógeno (Latham et al., 1979, como se cita en Hobson & Stewart, 1997). *S. bovis* cobra un papel importante en los problemas de acidosis láctica en rumiantes alimentados con exceso de almidón (Hungate et al., 1952, Hungate, 1966, Russell & Hino, 1985, como se cita en Hobson & Stewart, 1997).

*Butyrivibrio fibrisolvens* es estrictamente anaerobio y presenta estructura de pared celular Gram positiva y es la especie principal productora de butirato. Presenta una amplia variación genética de acuerdo con las secuenciaciones obtenidas de ADNr 16S (Forster et al., 1996, como se cita en Hobson & Stewart, 1997).

*Lachnospira multipara* es un bacilo Gram positivo capaz de degradar la pectina y aparece en grandes cantidades en el rumen de animales alimentados con leguminosas forrajeras (Bryant et al., 1960, como se cita en Hobson & Stewart, 1997).

Especies de *Eubacterium* son bacterias Gram positivas en cultivos nuevos, pero en cultivos adultos se destiñen con facilidad (Bryant, 1959, Prins et al., 1972, como se cita en Hobson & Stewart, 1997). *Eubacterium ruminantium* básicamente obtienen el nitrógeno a partir del amoníaco. Representa alrededor del 5% de las bacterias cultivables recuperadas del rumen bovino. *Eubacterium cellulosolvens* forma parte de al menos un 50% del recuento de bacterias celulolíticas en vacas bajo ingesta de heno y concentrados (Prins et al., 1970, como se cita en Hobson & Stewart, 1997).

Especies de *Lactobacillus* suelen encontrarse tanto en animales jóvenes como en adultos consumiendo concentrados (Alison et al., 1975, Bryant et al., 1985a, Jayne-Williams, 1979, como se cita en Hobson & Stewart, 1997). *Lactobacillus ruminis* es Gram positiva y móvil, básicamente produce ácido láctico. *Lactobacillus vitulinus* es también Gram positiva, pero no móvil, presenta un patrón de sustratos similar a los de *L. ruminis*, pero también la capacidad de consumir lactosa.

*Acetitomaculum* son bacilos Gram positivos que se han aislado en muestras ruminales de bovinos alimentados con dietas de alta proporción de forrajes (Hobson & Stewart, 1997).

No se conoce la funcionalidad de la mayoría de los microorganismos ruminales, y, muchos quedan sin recibir una clasificación taxonómica de género o especie Henderson et al. (2015).

## **2.7 Métodos de obtención de muestras de líquido ruminal en vacas lecheras para el estudio del microbioma**

La obtención de muestras de líquido ruminal posee dos grandes objetivos, diagnóstico de patologías, como acidosis o indigestión (Enemark, 2009), e investigación, como caracterizar el microbioma del rumen (Henderson et al., 2015) o comprender el impacto de la alimentación sobre las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) (Hristov et al., 2013). El término microbioma describe la comunidad ecológica de microorganismo de la muestra (Lederberg & McCray, 2001). Dado que aún no se conoce con certeza qué caracteriza a un microbioma benéfico, comprender estas comunidades de microorganismos podría ayudar en la toma de decisiones y a contribuir en una producción más sustentable (Perez et al., 2024).

A efectos del objetivo de este trabajo serán descritas dos vías para la obtención de líquido ruminal, por medio del método estándar que es la canulación ruminal (fístula) y, por medio de sonda oro-ruminal (método alternativo).

Canulación ruminal: comienza con un proceso quirúrgico que se realiza sobre el flanco izquierdo del rumiante a la altura del hueco del ijar, quedando definida la entrada directa hacia el rumen. La canulación propiamente dicha consiste en la colocación de una fístula (cánula) flexible que posee un tapón cilíndrico diseñado para ajustarse y sellar la entrada y, que permite la extracción directa tanto del alimento como del líquido ruminal cuando esta se destapa (Nan, 2002).

Sonda Oro-Ruminal: también puede encontrarse descrita como sonda esofágica. Es una técnica alternativa, no quirúrgica, desarrollada por Thomas Geishauser. Esta técnica de muestreo consta de una sonda, una bomba de succión y un recipiente para contener el fluido. Puede existir contaminación de la muestra mediante la saliva, lo que ocasiona un aumento del pH y de la concentración de sodio y, una disminución de la concentración de potasio. En la mayoría de los casos, la sonda alcanza el saco ventral del rumen a los dos metros (Geishauser, 1993). Uno de los mayores problemas a la hora de la toma de muestra es la obstrucción de los orificios del cabezal de la sonda o del tubo de aspiración, o la contaminación de la muestra con saliva (Geishauser, 1993).

Ramos-Morales et al. (2013) evaluaron diferentes parámetros a muestras de digesta ruminal en ovejas y cabras alimentadas con alfalfa y concentrado, a partir de canulación ruminal y sonda oro-ruminal, observando un número similar de bacterias totales en estos animales con ambos métodos previo a la ingesta, pero luego encontraron que “esta cantidad disminuyó significativamente cuando se muestreó tras la ingestión, lo cual sólo fue patente en las muestras tomadas a través de la cánula ( $p=0,011$ ) frente a las de sonda esofágica” (p. 845).

Con respecto a esto último, existe la posibilidad de que debido al efecto dilución generado por el consumo de la dieta, el número de bacterias obtenidas por sonda esofágica sea menor, ya que la muestra obtenida por cánula incluyó material líquido y sólido (Dehority, 2003, como se cita en Ramos-Morales et al., 2013).

Además, otra desventaja del método de muestreo por sonda es no conocerse de forma sencilla la ubicación del extremo de esta dentro del rumen, lo que aumenta la probabilidad de un mal muestreo, debido a que las poblaciones microbianas tienden a ser distintas según el lugar de donde se tome la muestra (caudal, dorsal, ventral, zona media). En este sentido, Larsen et al. (2020) estudiaron la ubicación de la sonda de forma manual a través de la cánula ruminal, en

vacas Holando bajo la misma alimentación, y encontraron que la posición real del muestreo dependía en gran medida de la consistencia de la fase sólida del material ruminal, lo cual relacionaron con factores intrínsecos de cada vaca. Categorizaron la fase sólida en tres tipos: blanda, normal y firme. Observaron que cuando la digesta era sólida, la sonda tendía a ubicarse en la región craneal y dorsal, y cuando la digesta era normal a blanda, la sonda tendió a ubicarse principalmente en la región ventral y algo en la zona media.

Así mismo, en trabajos realizados por de Assis Lage et al. (2020) y por Paz et al. (2016), encontraron que tanto la riqueza y diversidad microbiana como también el perfil microbiano logrado mediante sonda, puede ser similar al obtenido mediante el método de fístula.

Por otro lado, Martínez-Fernández et al. (2019) extrajeron líquido ruminal por fístula y analizaron el efecto de dos métodos de procesamiento de muestras comparando las OTUs logradas: congelación directa vs centrifugación de la muestra. Con la muestra centrifugada se eliminó el sobrenadante y se conservó la masa microbiana. Ambos métodos logaron una extracción exitosa y lecturas de calidad de ADN para su comparación. El método con centrifugación incrementó la riqueza microbiana y aumento la detección de bacterias Gram positivas, por lo que sugieren que el método de congelación directa podría retrasar la lisis de bacterias Gram negativas. Estos autores concluyeron respaldar el método de centrifugación de la muestra.

## **2.8 Métodos de identificación microbiana**

La identificación y clasificación de microorganismos es una práctica que puede ser utilizada para evaluar su diversidad en una muestra ambiental.

Existen tres métodos: fenotípicos, proteómicos y, moleculares. Los métodos fenotípicos centran su análisis en las características observables (morfología, formas de desarrollo, propiedades bioquímicas y del metabolismo); los métodos proteómicos caracterizan el grupo de proteínas que es capaz de codificar un tipo de genoma (proteoma); los métodos moleculares tienen la capacidad de identificar diferencias dentro de microorganismos que poseen similares características fenotípicas, basándose en genes que codifican para las subunidades ribosómicas tales como 5S, 16S, 23S, y así lograr establecer relaciones filogenéticas entre ellos (Fernández Olmos et al., 2010). A continuación, se desarrolla brevemente este último método, debido a su importancia en este trabajo.

### **2.8.1 Método molecular, análisis del ARNr 16S y secuenciación de amplicón**

Es el método más popular, rápido y preciso, que permite la identificación de microorganismos procariotas (Bukowska-Faniband et al., 2023).

Todas las bacterias y arqueas presentan este marcador (16S), y poseen operones que no modifican su función en el tiempo. El análisis del gen 16S permite obtener información filogenética gracias a que los datos obtenidos pueden compararse con base de datos públicas que poseen gran diversidad de secuencias de microorganismos ya reconocidas (Fernández Olmos et al., 2010).

La reacción en cadena de la polimerasa (reacción de PCR, o amplificación por PCR) es la base del procedimiento para la identificación bacteriana, ya que a partir de esta amplificación se logra aumentar el número de copias de ADN molde necesario para su posterior secuenciación en forma masiva.

La secuenciación total del gen presenta un tamaño aproximado de 1500 pares de bases (pb), constituido por 9 regiones variables (V1 a V9) y zonas conservadas comunes. Las zonas variables que se encuentran dentro de las zonas conservadas son las que permiten realizar la taxonomía comparativa (Fernández Olmos et al., 2010).

En términos muy generales, la PCR consta de 3 ciclos principales: desnaturalización de la doble cadena de ADN gracias al calentamiento de la solución, logrando la separación de la doble hélice; luego la hibridación, en este punto la temperatura se reduce para permitir que los primers (denominados también cebadores, los cuales son cadenas cortas de ADN cuidadosamente sintetizadas y que forman parte de la solución, necesarios para comenzar y terminar la reacción en un lugar específico del genoma) se apareen por complementariedad de base al ADN molde; por último, la polimerización propiamente dicha, donde la enzima ADN polimerasa cataliza la síntesis simultánea de las dos cadenas utilizando como insumo los cuatro nucleótidos (adenina, citocina, guanina, timina) que fueron suministrados en la solución en cantidad necesaria (Bukowska-Faniband et al., 2023). Al finalizar un primer ciclo de reacción, se obtiene el doble de material genético original, es decir que con cada ciclo de amplificación se aumenta al doble la cantidad de material genético del cual se partió.

Dependiendo de los objetivos de clasificación taxonómica, el tamaño de la lectura del gen requerida es variable. Por ejemplo, en caso de querer diferenciar taxones específicos, lograr encontrar diferencias entre cepas o, describir nuevas especies, debe conocerse la secuencia completa del gen ARNr 16S (Fernández Olmos et al., 2010).



El pool de amplicones logrados de la muestra ambiental de ARNr 16S es secuenciado, esto se conoce como metabarcoding, y es un paso sustancial para la posterior comparación con la base de datos pública. Un método para realizar esta tarea de obtener la lectura del gen es el método de secuenciación Illumina, también conocida como SBS (en español, secuencia por síntesis reversible), que permite determinar la secuencia de ADN (50 a 400 pb) de forma rápida y eficiente gracias a un avanzado equipo computacional donde cada muestra amplificada se somete a una nueva etapa de polimerización, pero con cada nucleótido diferencialmente marcado en forma química (fluoróforos) para emitir una señal lumínica al ser incorporados a la cadena. Durante este proceso el equipo captura imágenes de colores que se dan simultáneamente en todos los fragmentos del amplicón, y esos colores son relacionados a un nucleótido en particular. Los organismos que se pueden evaluar con esta plataforma (Illumina) en el análisis metagenómico con 16S ARNr, se reduce a bacterias y arqueas, no pueden detectarse eucariotas (Cortés-López et al., 2020). Las secuencias generadas por Illumina (y otro tipo de secuenciadores de segunda o tercera generación) se denominan “reads”, y en este caso representan los fragmentos del gen ribosomal 16S de la población.

### **2.8.2 Análisis bioinformático**

La secuenciación obtenida por Illumina se presenta en archivos informáticos de formato FastQ, donde se muestran las lecturas representadas en nucleótidos y la calidad de esas lecturas. Estos archivos son compatibles con el software estadístico R, donde mediante la utilización del paquete DADA 2, es posible depurar las secuencias mediante filtrado y recorte, eliminando cebadores y errores de secuenciación.

El objetivo es agrupar los reads para generar ASVs (Amplicon Sequence Variants, o en español Variantes de Secuencias de Amplicones), por lo que cada ASV es una secuencia única lograda a partir de varios reads con secuencias iguales o similares. Estos ASVs son utilizados para asignar grupos taxonómicos gracias a la utilización de la base de datos pública, donde se comparan las secuencias con reinos, familias, órdenes, especies, etc.

## **2.9 Un antecedente importante en el estudio de bacterias ruminales**

Como ya fue mencionado, las bacterias cumplen el rol fundamental de degradar la fibra vegetal mediante fermentación, haciendo aprovechable los nutrientes que no podrían ser digeridos por las enzimas propias del animal. Como consecuencia de esta fermentación se generan CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> que son liberados a la atmósfera y se producen AGV que el animal utiliza

como fuente de energía. Además, esa masa microbiana es una fuente fundamental de proteína para el rumiante cuando las bacterias continúan su paso por el tracto gastro intestinal.

En un estudio realizado por Henderson et al. (2015) donde relevaron y evaluaron la comunidad microbiana del rumen, utilizaron variables como el tipo de rumiante (bovinos, ovinos, cabras, cérvidos, entre otros), región del mundo (Norte América, Europa, Asia, Medio Oriente, Sud América, África, Australia) y tipo de dieta (F: dominadas por forraje, FC: 50 a 70% de forraje, CF: 50 a 70% de concentrado, C: dominada por concentrado). Estos autores encontraron que, a pesar de las variables, existen bacterias ruminales “dominantes” (o lo que puede denominarse un “microbioma bacteriano central”) que se encuentran en todas las muestras de líquido ruminal, conteniendo a los géneros *Prevotella*, *Butyrivibrio*, *Ruminococcus*, incluyendo a las familias *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, y a los órdenes *Bacteroidales*, y *Clostridiales*. La abundancia de estos grupos de bacterias fue relativa, siendo el factor más determinante la dieta, seguido por la especie de rumiante. En el caso concreto de los bovinos, estos autores encontraron que *Ruminococcus* es una de las bacterias más dominantes y se distribuye uniformemente a independencia de la dieta, si se quiere, existe una ligera tendencia de asociación positiva en dietas a base de forraje y una asociación ligeramente negativa en dietas a base de concentrado; *Butyrivibrio* también es una bacteria que no posee respuesta en su proporción con el tipo de dieta; *Fibrobacter* y *Clostridiales* (principalmente), seguido de las *Ruminococcaceae* y *Bacteroidales*, poseen una asociación positiva en dietas a base de forraje, y van perdiendo importancia relativa al aumentar la proporción de concentrado en la dieta; en el caso de *Prevotella* (principalmente) y *Succinivibrionaceae*, poseen una asociación negativa en dietas con alta proporción de forraje, y estas bacterias van tomando importancia relativa a medida que aumenta el porcentaje de concentrado en la dieta; por último, dichos investigadores encontraron que en el caso de las *Veillonellaceae* existe una asociación negativa en su proporción cuando la dieta a base de forraje, y esta asociación se va neutralizando (correlación en torno al cero) a medida que aumenta la proporción de concentrado en el alimento.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Ubicación espacial y temporal

El experimento se desarrolló desde el 18 de febrero al 10 de junio de 2022, en la Unidad de Lechería de la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC), de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República (UdelaR), ubicada en el departamento de Paysandú, Uruguay.

#### 3.2 Diseño experimental

Los procedimientos experimentales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la UdelaR, Montevideo, Uruguay (número de expediente: 020300-000055 22).

Este trabajo se enmarca en un proyecto de 60 vacas Holando-americano durante el periodo de transición, sometidas a tres tratamientos de aditivos en la dieta.

Del total de hembras, 24 fueron primíparas y 36 multíparas. Las mismas fueron inseminadas en el invierno del 2021, y la fecha de parto promedio estimada fue 24 de marzo del 2022  $\pm$  12 días.

El peso vivo (PV) promedio fue de 581 $\pm$ 14 kg en primíparas y 655 $\pm$ 12 kg en multíparas, obteniendo un PV promedio total de 625,4 $\pm$ 12,8 kilogramos.

En el proyecto mencionado, los animales se sometieron a la misma dieta, pero se dividieron en tres grupos (20 animales cada uno) según la adición de aditivos en el alimento, un grupo donde se les suministraba monensina en el concentrado, otro grupo donde se les suministraba extracto de plantas en el concentrado, y por último un grupo de tratamiento control con un aditivo placebo. La inclusión de estos aditivos se da luego de los 30 días preparto. Es importante mencionarlo ya que podría ser parte de la variación existente dentro del experimento que presenta en este trabajo (en las muestras posparto +35 y +65 días).

A continuación, se detallan los tratamientos de dicho proyecto:

Tratamiento control (TC): Sin agregado de aditivo.

Tratamiento con monensina (TMon): 300 mg/vaca/día de monensina.

Tratamiento con extractos vegetales (TexV): 50x10<sup>3</sup> mg/vaca/día de aditivo a base de aceites esenciales (aditivo comercial).

Para la realización del experimento que se presenta en este trabajo, del total de 60 animales, se planificó utilizar nueve vaquillonas, seleccionando 3 grupos según el aditivo

utilizado en el proyecto (cada grupo con tres animales), y se fistularon y canularon a nivel de rumen (cánulas Kell®, Brasil). Comenzando el experimento, estos 9 animales, promediaban  $608 \pm 66$  kg de PV y CC de  $3,3 \pm 0,3$  en la escala de 1 a 5. Como ya se adelantó, los animales en el momento -30 (30 días antes del parto) no poseían la inclusión de los aditivos en la dieta, y estaban pastoreando una pradera perenne de calidad media, por lo que este momento se toma como línea base. Se sometieron a extracciones de líquido ruminal a través de fístula y sonda oro-ruminal con el objetivo de comparar ambos métodos mediante el estudio de su microbiota.

Método estándar: extracción de líquido ruminal mediante fístula.

Método alternativo: extracción de líquido ruminal mediante sonda oro-ruminal.

Estas muestras se realizan en tres momentos en torno al día cero (día del parto): -30 (30 días previo al parto); +35 (35 días después del parto); +65 (65 días después del parto).

### **3.3 Manejo general**

#### **3.3.1 Ingreso de animales al experimento**

Partiendo de la fecha estimada de parto para cada animal, ingresaron al experimento 30 días preparto, previamente se hace registro de peso vivo e identificación visual de cada vaca según su tratamiento a nivel del proyecto: caravana verde (TC); roja (TMon); azul (TexV). El mismo día se realiza el primer muestreo de líquido ruminal en las vaquillonas seleccionadas para este trabajo.

A medida que fueron ingresando se asignaron 4 animales por corral (bloques previamente diseñados) dentro de un sistema de cama caliente.

#### **3.3.2 Cama caliente**

Se trata de un sistema que ayuda a mejorar el confort de los animales y a solucionar determinados problemas ambientales (contaminación por efluentes). La cama contiene materiales orgánicos no lesivos para el animal, con alto %MS y una alta relación carbono/nitrógeno (C/N).

Consta de un galpón completamente techado, con ventilación (natural y ventiladores), así como aspersores. El área de cama fue de  $13,5 \text{ m}^2/\text{animal}$ , siendo utilizado como sustrato aserrín de eucaliptus y pino, chips de madera, cáscara de pino y cáscara de arroz. El material se airea dos veces al día utilizando un cincel y se adiciona alrededor de 15 cm de sustrato nuevo cada 15-20 días, según la temperatura y humedad de la cama. También cuenta con un área de alimentación adyacente con piso y comederos de cemento, y bebederos.

Cuenta con 16 corrales distribuidos en dos líneas paralelas (8 de cada lado) con un corredor central. Cada corral cuenta con 6 metros de frente; 9 metros de profundidad (3 metros de plataforma y 6 metros de cama). El área total es de 54m<sup>2</sup> (18m<sup>2</sup> de plataforma de alimentación y 36m<sup>2</sup> de cama). Dentro de la plataforma se encuentra el bebedero, aspersores y comedero de hormigón. Los comederos de cada tratamiento son debidamente separados de los de otros tratamientos para evitar que los animales contiguos consuman el aditivo que no les corresponde.

### **3.3.3 Alimentación**

En la mañana se prepara la dieta según corresponde en cada tratamiento del proyecto (TC, TMon, TexV) utilizando un mixer Mary (modelo M55), se procede a suministrar en los comederos, se limpia el equipo y se continua con el siguiente tratamiento evitando así contaminaciones entre estos. Se repite el procedimiento en cada tratamiento.

Durante el manejo preparto, previo al suministro del concentrado, se mide el rechazo del día anterior, recogiendo todo el sobrante y pesando en forma diaria. Por otra parte, se realiza lectura de comedero cada 2 horas aproximadamente, 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes), utilizando una escala de apreciación visual con valores de 0 a 4: score 0, comedero lamido; score 1, capa fina sobre el piso, menos del 25% de remanente; score 2, entre 25 y 50% de remanente; score 3, más del 50% del remanente; score 4, comedero sin tocar (Casella & Ciuffolini, 2005).

Dieta preparto: los animales se encontraban en confinamiento, con una asignación de TMR, complementada con sales aniónicas como método preventivo de trastornos metabólicos (como hipocalcemia) en el parto.

En la Tabla 3 se presenta la composición de esta. Como se mencionó anteriormente, la única variación entre tratamientos corresponde a los aditivos.

A las primíparas se les asigna 12,6 kg MS/vaca/día y a los multíparas 15,4 kg MS/vaca/día.

Dieta posparto: Se manejan las vacas bajo un sistema de semi confinamiento, donde pastorean durante la mañana hasta la tarde, desde las 7:30 am hasta las 3:30 pm, y durante la noche permanecen encerradas donde consumen ración parcialmente mezclada (PMR) detallada en la Tabla 3. Se suministran 13,2 kgMS/vaca/día en primíparas y 15,3 kgMS/vaca/día en multíparas.

**Tabla 3***Composición de dietas suministradas en preparto (TMR) y posparto (PMR)*

Alimento	Tipo de dieta			
	TMR (kgMS/vaca/día)		PMR (kgMS/vaca/día)	
	Primípara	Múltipara	Primípara	Múltipara
Paja de cebada	3,96	4,84	-	-
Ensilaje de maíz	4,88	5,96	4,08	4,73
Heno de alfalfa	-	-	1,81	2,1
Concentrado	3,75	4,6	7,31	8,48
TOTAL	12,6	15,4	13,2	15,3

*Nota.* TMR: dieta totalmente mezclada. PMR: dieta parcialmente mezclada. MS: materia seca.

El pastoreo se realizó en franjas semanales mediante la adaptación de la técnica del doble muestreo, y se buscó maximizar el consumo de materia seca (CMS) de la pastura mediante una oferta de 30 kg MS/vaca/días estimados al ras de del suelo. Las pasturas consumidas durante todo el periodo fueron Avena, Alfalfa, Festuca y Achicoria. Se procuró que, durante los momentos de muestreo, las vacas estuvieran consumiendo alfalfa. En la Tabla 4 se presenta la composición química de las mismas.

**Tabla 4***Resultado del análisis de la composición química de las pasturas ofrecidas*

Componente (%)	Alfalfa	Achicoria	Festuca	Avena
MS	20	11,8	18,9	15
MO	90,1	85,7	88	88,1
FDN	28,7	26,3	43,5	36,6
FDA	20	18,1	25,4	20,9
PC	24,5	24	17,3	20,1
CNF*	35,8	32,9	26,2	28,1
EE	1,05	2,46	1,1	3,32

*Nota.* Valores expresados en base seca. MS: materia seca. MO: materia orgánica. FDN: fibra detergente neutro. FDA: fibra detergente ácido. PC: proteína cruda; \*CNF: carbohidratos no fibrosos:  $CNF = 100 - (FDN + PC + EE + CC)$ . EE: Extracto etéreo. CC: Cenizas.

### 3.3.4 Ordeño

Se realizan dos ordeños diarios, matutino y vespertino.

En la mañana las vacas eran retiradas de los corrales para comenzar el ordeño a las 4:00 am, y en la tarde eran arreadas desde la pastura a la sala para comenzar el ordeño a las 4:00 pm. La distancia recorrida nunca supera 1 km.

### **3.3.5 Ajustes circunstanciales**

A medida que se dieron los partos fueron cambiando de corral (de parto a corrales posparto). En determinado momento, la cantidad de corrales bajo sistema de cama caliente no fue suficiente para mantener separado a los tratamientos y a los animales parto y posparto, por lo que se utilizaron como apoyo corrales externos con sistema a cielo abierto. Se trató de que las primíparas posparto permanecieran bajo el sistema de cama caliente.

## **3.4 Muestreo**

### **3.4.1 Extracción de muestras**

Los animales fueron ingresados a las mangas para cada muestreo, y en el caso de la extracción por sonda oro-ruminal, el procedimiento fue ayudado con un cepo y un levanta quijada. Las muestras se realizaron en el horario de la mañana cuando los animales estaban en ayuno, previo al ordeño.

Materiales y consideraciones para muestreo con sonda: una sola sonda plástica blanda de 2,5 metros por cada vaca. Cada una cuenta con dos orificios cada 5 cm en el extremo, el cual se lija para evitar lesiones al entrar. Se utiliza un caño de plástico duro de unos 50 cm para evitar que la sonda se dañe por acción del masticado del animal, este caño es de un calibre mayor para permitir el ingreso de la sonda por su interior. Primeramente, se coloca el caño de mayor calibre y se procura que el animal tienda a deglutirlo mientras se sostiene con una mano. Una vez que se asegura que este implemento ha conectado con el esófago gracias a el instinto animal de ingerirlo, se procede a la introducción de la sonda lentamente hasta llegar a la cavidad ruminal. Una vez dentro, para comenzar la extracción de contenido ruminal, se realizan movimientos axiales y posteriormente un bombeo de vacío (con una bomba manual especialmente diseñada). Al notar la aparición de contenido ruminal en la sonda, esta se va retirando, mientras se continúa con la presión de vacío. Se evita colocar material con exceso de saliva descartando la primera fracción de contenido desde el extremo de la sonda donde se encontraba conectada la bomba. La muestra se vierte en un tubo estéril y rotulado de 50 ml.

Materiales y consideraciones para muestreo por fístula: se utiliza la misma sonda (previamente limpia) con la que se extrajo contenido ruminal en forma oro-ruminal. Al destapar la fístula, se hace ingresar, procurando atravesar el material fibroso de la fase sólida hasta llegar a la zona ventral del rumen y entrar en contacto con la fase líquida. Nuevamente con la ayuda de la bomba de vacío se procede a la extracción y se almacena el contenido en otro tubo estéril y rotulado.

### **3.4.2 Conservación de muestras**

Durante la operación de extracción, a medida que los tubos son llenados, se colocan debidamente refrigerados en una conservadora de poliestireno expandido.

Al finalizar el trabajo en mangas, las muestras obtenidas son procesadas en el laboratorio, los frascos de 50 ml con el contenido ruminal son centrifugados a 10.000 rpm, 4°C, durante 10 minutos. Una vez finalizada la centrifugación se procede a la extracción del material sedimentado, con la utilización de pipetas estériles, trasegando en 2 frascos (estériles y debidamente rotulados) de 2 ml cada uno. Estos frascos pequeños son la muestra a partir de la cual se evaluará la población microbiana, por lo que su conservación a -80°C es de vital importancia.

### **3.5 Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN se utilizó el kit ZymoBIOMICS siguiendo los pasos del fabricante. Este kit fue seleccionado ya que está desarrollado para optimización de extracción de ADN microbiano. De acuerdo con los fabricantes el kit permite purificar el ADN de bacterias gram negativas y gram positivas, hongos, y protozoos. La lisis celular se realiza de forma mecánica mediante la utilización de la tecnología Bashing Beads por agitación de perlas de cerámica de alta densidad (resistentes a las fracturas, sin reacciones con el medio, y tamaños de 0,5 mm y 0,1 mm), aunque la eficiencia de la lisis depende de la velocidad y el tiempo de agitación. En este caso se utilizó un vórtex Genie 2 durante 30 minutos a máxima velocidad.

### **3.6 Secuenciación del gen 16S**

La composición de las comunidades microbianas en rumen se determinó por medio de la secuenciación del gen 16S, también conocido como metabarcoding 16S o secuenciación de amplicones 16S. Para la secuenciación de las muestras se contrató a la empresa Novogene ([www.novogene.com](http://www.novogene.com)). El servicio contratado incluyó la amplificación de la región V3-V4 del gen 16S y la secuenciación paired-end con la plataforma MiSeq de Illumina.

La zona de interés (región V3-V4 del gen 16S) es amplificada por PCR utilizando los siguientes primers (cebadores):

341F: CCTAYGGGRBGCASCAG

06R: GGACTACNNGGGTATCTAAT



### 3.7 Procesamiento y evaluación de los datos de secuenciación

Para el análisis inicial de las secuencias, identificación de los ASVs, así como para su asignación taxonómica, análisis estadísticos y gráficos, se utilizó el paquete DADA2 del software estadístico R (versión 4.3.1). El script utilizado para el análisis se puede encontrar en el repositorio público GitHub (<https://github.com/camisimoes44/analisis-microbioma-ruminal>).

A modo de resumen, en primer lugar, los archivos FastQ generados por la plataforma de secuenciación (Illumina) son leídos a través de funciones específicas del paquete DADA2. Estos archivos contienen la secuencia de nucleótidos juntos con la información de calidad de cada lectura (probabilidad de error en cada posición). A cada muestra le corresponde 2 archivos uno con las lecturas en dirección forward (R1, extremo de ida) y otro con las lecturas en dirección reverse (R2, extremo de vuelta) que son obtenidas mediante la secuenciación paired-end (se lee cada fragmento de ADN por ambos extremos).

DADA 2 utiliza los datos de calidad de estos archivos para modelar los errores de secuenciación e identificar con precisión las variantes de secuencias de amplicones (ASVs), es decir, busca diferenciar si las variantes de deben a verdaderos reads distintos o a errores en los procesos.

El procedimiento para obtener los ASVs y su asignación taxonómica constó de 6 pasos: 1- inspección de calidad; 2- filtrado de lecturas, eliminando reads completos o extremos de baja calidad; 3- modelado de errores a partir de los archivos FastQ filtrados; 4- unión de las lecturas R1 y R2 en pares y eliminación de quimeras (secuencias mal logradas en el proceso de PCR); 5- construcción de tabla de ASVs; 6- asignación taxonómica a partir de los ASVs logrados comparados con la base de datos pública Silva (versión 138.2).

Para determinar si la profundidad de secuenciación fue suficiente para capturar la diversidad de cada muestra se realizaron curvas de rarefacción con la función *"rarecurve()"* del paquete *"vegan"*.

Para evaluar si algunas secuencias dominan fuertemente la comunidad o si existe un mayor equilibrio se realizó un ranking de abundancia relativas con la función *"amp\_rankabundance()"* del paquete *"ampvis2"*.

Los porcentajes de clasificación en cada nivel taxonómico (reino, filo, clase, orden, familia, género, especie) fueron determinados a partir de las abundancias relativas con el paquete *"mia"*.

De la misma manera, todas las medidas, índices e indicadores de diversidad alfa fueron estimados con funciones propias del paquete “*mia*”.

Los análisis estadísticos y comparativos, tanto a nivel de la variable de mayor interés (método de muestreo), como también de las variables momento de muestreo y tratamiento se realizaron aplicando estrategias adecuadas para cada caso en todos los casos usando funciones de distintos paquetes de R.

Para comparar la diversidad alfa (riqueza observada e índice de Shannon dentro de una muestra) se aplicaron pruebas estadísticas de Wilcoxon y se representó su distribución en gráficos de caja (boxplots). Se aplicaron funciones como “*ggplot()*”, “*geom\_boxplot()*” del paquete “*ggpubr*”.

La diversidad entre muestras (diversidad beta) se evaluó mediante análisis multivariados, se realizó PCoA a partir de distancias Bray-Curtis. Se utilizaron funciones como “*runMDS()*”, “*runNMDS()*”, “*plotReducedDim()*”, “*vegdist()*”

Se realizó análisis de redundancia (RDA) para determinar la influencia de las variables experimentales con la función “*runRDA()*”.

Se aplicó un análisis de abundancia diferencial para identificar géneros con abundancias significativamente distintas entre métodos gracias a la utilización del paquete “*mia*” y funciones como “*agglomerateByRank()*” para agrupar a nivel de géneros, “*addPrevalence()*”, “*agglomerateByPrevalence()*” para filtrar por prevalencia.

Se estimó la correlación de abundancias relativas de géneros entre métodos a nivel global y por momento de muestreo, utilizando los coeficientes de Pearson y Spearman gracias a la función “*round(cor(x,y, method = "Pearson"))*”, según corresponda, y se realizaron gráficos de dispersión para visualizar la variabilidad entre pares de muestras (sonda y fístula).

Se calcularon los coeficientes de variación (%CV) promedio a nivel global entre sonda y fístula, y se los comparó con las abundancias relativas promedio de los géneros, con el objetivo de analizar la relación entre la variabilidad observada (%CV) y el nivel de abundancia promedio de cada género.

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Cantidad de muestras

Para cumplir con los objetivos planteados se seleccionó un total de siete vaquillonas que fueron muestreadas en tres puntos temporales (una muestra preparto y dos muestras en el postparto), cada una de ellas con los dos métodos de extracción de líquido ruminal (sonda oro-ruminal y fístula) tal como se detalla en materiales y métodos, sumando un total de 42 muestras. Si bien la extracción de ADN fue exitosa en todos los casos únicamente 35 se lograron secuenciar, de las cuales 18 corresponden a fístula y 17 corresponden a sonda. En la Tabla 5 se resume la información del número de muestras que lograron ser analizadas.

**Tabla 5**

*Detalle del número de muestras analizadas*

Tiempo de muestreo (días)	Método de extracción	
	Fístula	Sonda
-30	6	6
+35	6	6
+65	6	5

*Nota.* -30: 30 días previo al parto. +35: 35 días después del parto. +65: 65 días después del parto.

### 4.2 Cantidad de reads obtenidos

Los reads (secuencias) obtenidos por ilumina en el total de las muestras fue de 7.197.485, por lo que cada muestra posee en promedio 205.642 secuencias (imputs promedios por muestra). Una vez depuradas las secuencias con el paquete DADA 2 en el software estadístico R (versión 4.3.1), se obtienen un total de 3.431.227 de conteos de secuencias en el total de las muestras, es decir unas 98.035 secuencias por muestra en promedio una vez eliminadas las secuencias quiméricas. A continuación, se presenta la Tabla 6 con el detalle de las secuencias de cada muestra y el proceso en DADA 2.

**Tabla 6**

*Números de secuencias de cada muestra que sobreviven a cada paso del “pipeline” de DADA2*

Muestra	Input	Filtered	DenoisedF	DenoisedR	Merged	Nonchim
V1_-30_F	204680	190479	182123	180605	131493	93332
V1_-30_S	202877	178212	169290	167740	114030	81830
V1_35_F	211617	197091	190405	188360	143059	102075
V1_35_S	206243	190371	184340	182008	138572	80168
V1_65_F	203162	189411	184192	182615	147763	105724
V2_-30_F	204516	190507	178730	176601	112423	80555
V2_-30_S	203912	185425	175484	174873	119963	87518
V2_35_F	205492	191670	184354	182710	137906	107123
V2_35_S	204879	191487	183780	181567	134588	100952
V2_65_F	212379	197304	190165	187957	142126	106178
V2_65_S	202846	189999	183330	182004	143585	106146
V3_-30_F	205933	191347	181837	179522	119529	82010
V3_-30_S	206322	190744	178902	175836	105773	70737
V3_35_F	205215	192318	186418	185197	148869	96908
V3_35_S	202672	189197	183382	182220	146778	96055
V3_65_F	202659	188965	184932	184373	158444	119642
V3_65_S	207389	190677	185572	184360	150344	119925
V4_-30_F	206314	188535	180022	177729	123351	79599
V4_-30_S	202092	183691	174589	172203	115596	71558
V4_35_F	202549	189159	185088	184360	158149	101684
V4_35_S	202359	180992	175731	174571	144562	86618
V4_65_F	205125	190527	184984	184320	151111	108218
V4_65_S	203650	190200	186363	185738	162410	127675
V5_35_F	211009	188268	183082	182354	151246	103842
V5_65_F	203602	193237	186411	185095	144195	88284
V5_65_S	203347	194283	186308	184481	135096	92276
V6_-30_F	218090	208017	199440	197231	147728	104889
V6_-30_S	203297	193324	184786	182482	135613	107053
V6_35_S	213031	189774	184025	182230	142415	103125
V7_-30_F	202907	194529	186362	185168	136317	100037
V7_-30_S	204779	183295	174415	172963	122815	93675
V7_35_F	206770	196276	188596	187359	142392	87636
V7_35_S	203837	194120	188318	187666	154174	103871
V7_65_F	205553	195351	190954	189750	162709	126359
V7_65_S	206381	196506	190099	188244	146618	107950

*Nota.* Muestra: (“número de vaca” \_ “día de muestreo” \_ “método de extracción”). Método de muestreo: Sonda (S) y Fístula (F). Input: secuencias crudas obtenidas del secuenciador.

Filtered: secuencias que pasaron el filtrado de calidad. DenoisedF: lecturas del extremo

Forward. DenoisedR: lecturas del extremo Reverse. Merged: lecturas forward y reverse que se unieron correctamente. Nonchim: lecturas finales tras eliminar las quiméricas.

A continuación, se presenta un resumen del promedio de las secuencias según la condición de muestreo.

**Tabla 7**

*Promedio descriptivo por condición de muestreo para cada paso del “pipeline” de DADA2*

Muestra	Input	Filtered	DenoisedF	DenoisedR	Merged	Nonchim
-30_S	203880	185782	176244	174350	118965	85395
-30_F	207073	193902	184752	182809	128474	90070
+35_S	205504	189324	183263	181710	143515	95132
+35_F	206508	192759	186329	185073	145420	99901
+65_S	204723	192333	186334	184965	147611	110794
+65_F	205413	192466	186940	185685	151058	109068

Durante este proceso en DADA2 los reads son agrupados en fragmentos de ADN según una secuencia única (ASV).

**Tabla 8**

*Muestras que no lograron secuenciarse*

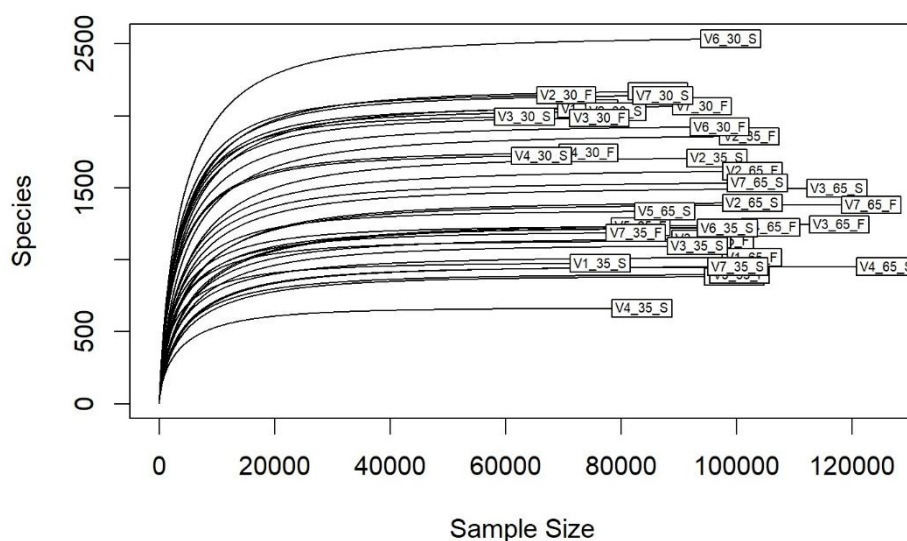
N° vaca	Momento	Método
1	+65	S
5	-30	S
5	-30	F
5	+35	S
6	+35	F
6	+65	F
6	+65	S

Siete de las 42 muestras obtenidas no lograron ser secuenciadas, generando un faltante de dos muestras preparto y cinco muestras posparto.

Con el fin de evaluar si la cantidad de reads analizados fue suficiente, se presentan a continuación las curvas de rarefacción.

**Figura 3**

*Curvas de rarefacción de muestras según número de reads analizados y los ASVs observados*



*Nota:* Sample Size: cantidad de lecturas (reads). Species: cantidad de ASVs.

En la Figura 3 se observa cómo a medida que se toman azarosamente los reads analizados (eje de las abscisas) se van acumulando los distintos tipos de ASVs. Cada curva representa una muestra determinada (vaca/momento/método). Al comienzo de cada curva el número de ASVs aumenta rápidamente, indicando la aparición de nuevas variantes taxonómicas. Aproximadamente, a partir de los 15.000 reads las curvas comienzan a estabilizarse obteniendo un comportamiento asintótico (plateau), sugiriendo que la profundidad de secuenciación (cantidad de reads obtenidos) fue adecuada, ya que se logró capturar prácticamente toda la diversidad presente en cada muestra.

A las secuencias obtenidas se les aplicó un primer filtro general de abundancia y prevalencia para disminuir la alta cantidad de datos. Dicho filtro general aplicó la regla de tener al menos un conteo de secuencia por cada ASV en un 5% de las muestras.

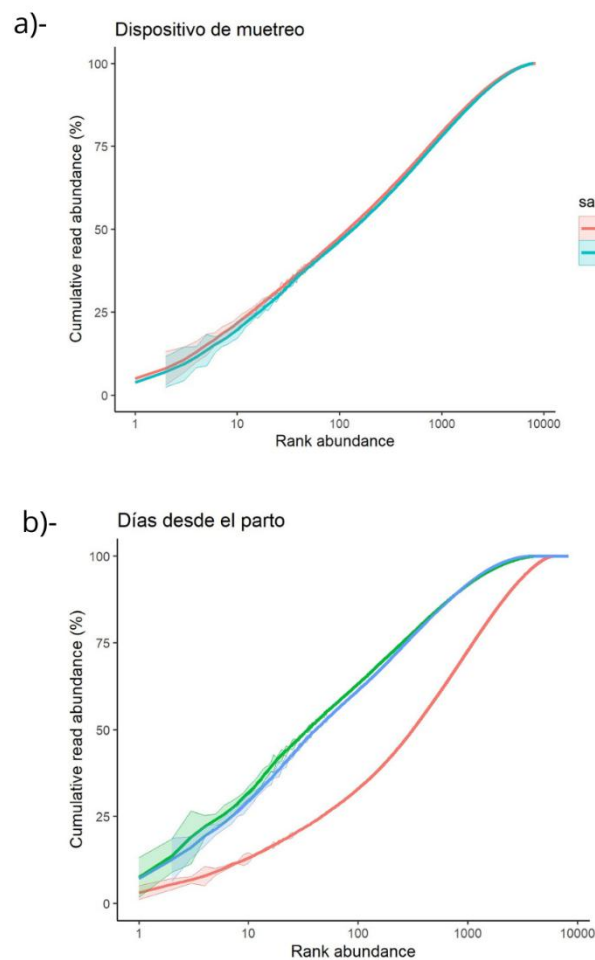
El filtro general logró pasar de 43.000 ASVs totales a 8.000, y con esta cantidad de ASVs se realizó: riqueza y abundancia relativa de reads, diversidad alfa de ASVs, PCoA de ASVs, clasificación taxonómica, diversidad alfa de géneros, PCoA de géneros.

A continuación, se presentan gráficos de riqueza y abundancia relativa donde se relacionan las secuencias obtenidas en función de los ASVs logrados con este filtro, para los cuatro grupos de variación (método de extracción, momento de muestreo, vaca, tratamiento).

### 4.3 Riqueza y abundancia relativa de los reads en función de los ASVs una vez aplicado el primer filtro

**Figura 4**

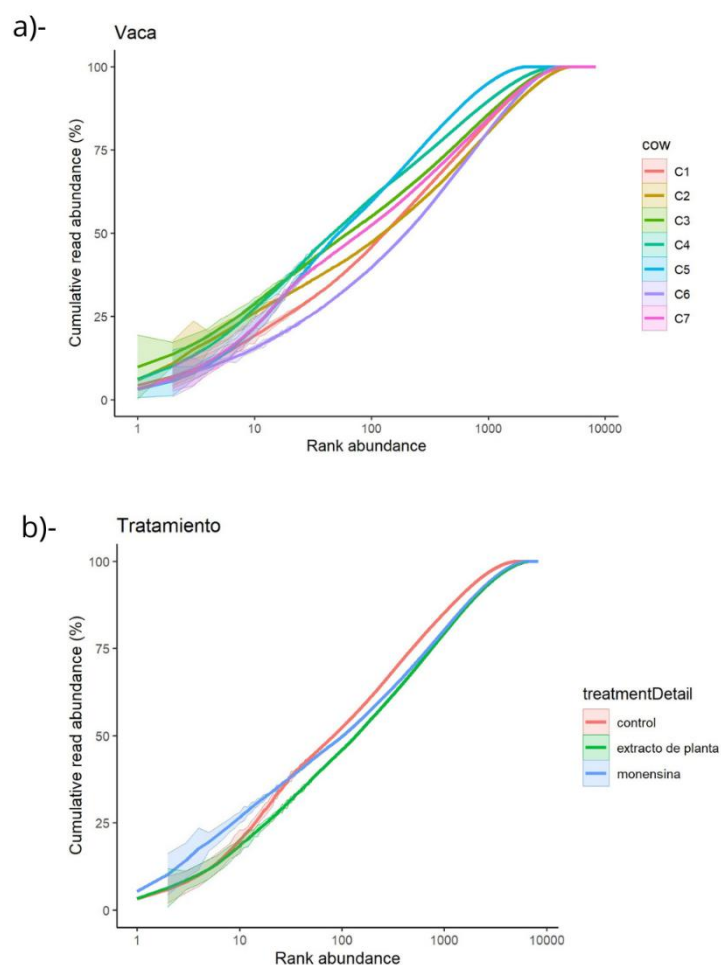
*Curvas de riqueza y abundancia relativa para método de muestreo y momento de muestreo*



*Nota.* Ejes de abscisas en escala logarítmica. a): Curva de riqueza y abundancia relativa de los reads en función de los ASVs logrados para los dos métodos de extracción. b): Curva de riqueza y abundancia relativa de los reads en función de los ASVs logrados para los tres momentos de extracción.

**Figura 5**

*Curvas de riqueza y abundancia relativa por vaca y por tratamiento*



**Nota.** Ejes de abscisas en escala logarítmica. a): Curva de riqueza y abundancia relativa de los reads en función de los ASVs logrados por vacas muestreadas. b): Curva de riqueza y abundancia relativa de los reads en función de los ASVs logrados para los tratamientos de adición de aditivos.

Los gráficos de la Figura 4 y la Figura 5, representan la proporción del total de los reads a medida que se acumulan los ASVs logrados, dicho de otra forma, se puede observar cuantos reads fueron necesarios para agrupar una determinada cantidad de ASVs. A modo de ejemplo, en el gráfico “a” de la Figura 4 se observa como con aproximadamente un 20% de los reads logrados se obtuvieron unos 10 ASVs, tanto para sonda como para fístula.

En la Figura 4, en el gráfico “a” las curvas para cada método de extracción de muestras son muy similares, por lo tanto, podría decirse que la distribución del “conteo” entre especies (ASV) es similar, aunque las poblaciones microbianas podrían ser muy diferentes.



Esto es un indicio de que, bajo la metodología realizada, la extracción por sonda oro-ruminal permitiría muestrear de forma correcta la población microbiana del líquido ruminal.

En el gráfico “b” de la Figura 4, se observa cómo el momento de extracción del líquido ruminal es una variable importante en el tipo y cantidad de taxones microbianos que se pueden encontrar, esta diferencia se da fundamentalmente cuando se dividen esos momentos en preparto y posparto, ya que ocurren cambios tanto fisiológicos como alimenticios. Las curvas de riqueza y abundancia son similares entre los momentos +35 y +65 días, y difieren en forma contundente del día -30. Estas diferencias no sólo alertan de que pueden existir cambios en el microbioma ruminal de una vaca primípara en la transición, sino que también dejan de manifiesto que esas diferencias se dan a nivel de la diversidad microbiana. En este tipo de figuras, las curvas con menor pendiente (como al inicio de la curva del momento -30) implican una mayor diversidad, por el hecho de que los ASVs se reparten en una forma más equitativa entre los reads logrados. En el preparto, las vacas se alimentan con una dieta forrajera (alta en fibra y baja en energía rápidamente disponible), ya que los requerimientos nutricionales durante este periodo son menores. Una dieta más fibrosa podría favorecer una mayor diversidad microbiana, ya que las interacciones con bacterias no fibrolíticas contribuyen a mejorar la digestión de la fibra (Koike & Kobayashi, 2009). Asimismo, la propia digestión de la fibra genera un ambiente fisicoquímico óptimo (para el cual el rumen ha evolucionado naturalmente) que promueve el desarrollo microbiano y previene la pérdida de bacterias fibrolíticas (Russell & Rychlik, 2001). Profundizando en el tema de un ambiente ruminal óptimo, se podría pensar que es posible que exista una correlación positiva entre una dieta más fibrosa y una mayor diversidad microbiana, dado a que dicha dieta “logra” mantener un pH ruminal adecuado (6,7 - 6,8) favoreciendo un mayor número de taxones (aumento de la diversidad microbiana), especialmente las bacterias que fermentan la fibra; un pH más bajo por consumir carbohidratos rápidamente fermentables que elevan abruptamente la concentración de AGV y  $H^+$ , puede inhibir o eliminar algunas especies procariotas, reduciendo así la diversidad.

En la Figura 5, en el gráfico “a”, puede apreciarse la variabilidad dentro de cada vaca, la cual puede deberse en parte a factores intrínsecos del animal (genéticos, selección de alimento). Sin embargo, como se observaba en la Tabla 8, es muy probable que esta se explique por el desbalance de muestras analizadas (de 42 muestras sólo 35 fueron secuenciadas).

En el gráfico “b” de la Figura 5, se observa la diversidad según los tratamientos asignados en el proyecto. En este caso, se aprecian algunas diferencias, especialmente al inicio del gráfico, donde los tratamientos con extractos de plantas (TexV) y el control muestran a priori una mayor

diversidad de taxones microbianos respecto al tratamiento con monensina. Este aspecto podría ser explorado en futuros estudios.

#### 4.4 Cantidad y porcentaje de secuencias clasificadas en los distintos taxones una vez aplicado el primer filtro

Las secuencias de cada muestra fueron clasificados en distintos niveles taxonómicos gracias a la base de datos Silva (versión 138.2), y para utilizarla junto con DADA2, esta base de datos debe estar formateada (Callahan, 2024).

**Tabla 9**

*Cantidad de taxones detectados en cada categoría y porcentaje promedio de secuencias clasificadas por categoría*

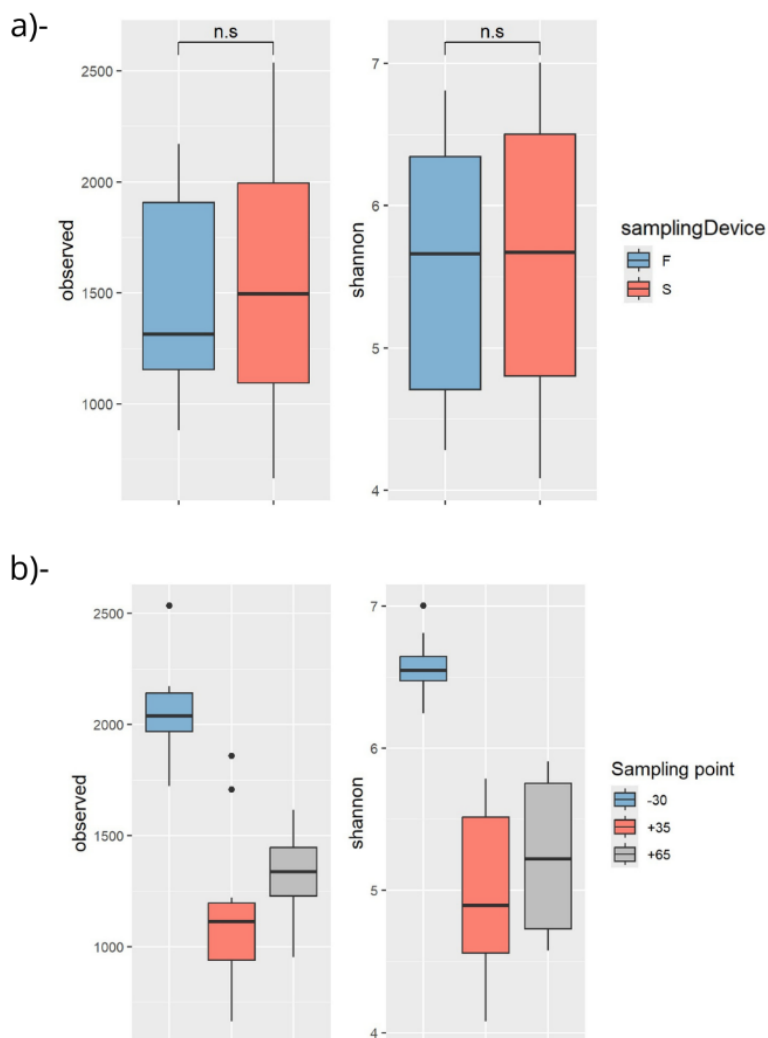
Categoría	N° taxones detectados	% de reads por categoría
Reino	2	100
Filo	25	99,98
Clase	36	99,98
Orden	70	99,90
Familia	99	98,21
Género	200	86,17
Especie	-	8,10

#### 4.5 Diversidad alfa de ASVs para los 4 grupos de variación (método de extracción, momento de muestreo, vaca, tratamiento) una vez aplicado el primer filtro

A modo lograr una mayor comprensión de la discusión, se presenta a continuación la descripción realizada por Pla (2006) para el índice de diversidad de Shannon-Wiener: el índice de diversidad de Shannon-Wiener ( $H$ ) es una medida estadística que cuantifica la diversidad de especies en un ecosistema. Describe la heterogeneidad de una comunidad considerando el número de taxones existentes y su abundancia relativa. “ $H$ ” expresa el nivel de incertidumbre para predecir el taxón de un individuo elegido al azar dentro de la comunidad. Cuanto más frecuente sea un taxón (la probabilidad de que aparezca es alta) la incertidumbre disminuye y por lo tanto menor será el valor de  $H$ , reflejando baja diversidad. El índice toma el valor de “0” cuando no existe incertidumbre, es decir, sólo existe un taxón. Con el fin de comprender mejor cómo es que  $H$  tiene en cuenta tanto la cantidad como la abundancia de taxones, es interesante pensar en el antilogaritmo de  $H$  ( $e^H$ ). Esta ecuación permite, bajo una muy alta incertidumbre, cuantificar el número de taxones necesarios (igualmente abundantes) para lograr un determinado valor de  $H$  (Pla, 2006). Esto sugiere que, por ejemplo  $H=7,244$  se da cuando la abundancia relativa es similar en 1400 taxones.

**Figura 6**

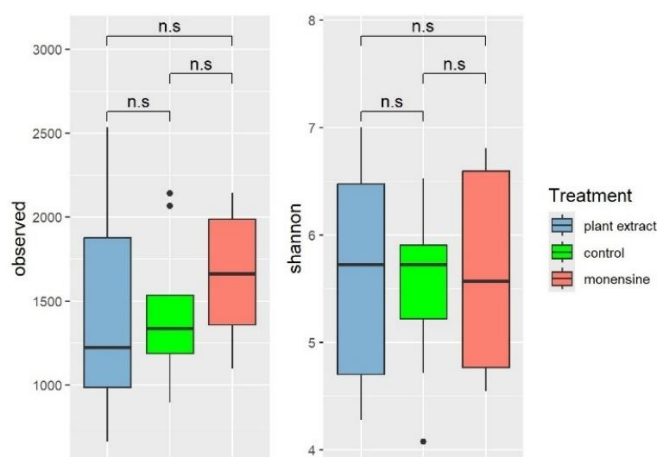
Diversidad alfa de ASVs para método de muestreo y momento de muestreo



*Nota.* a)- Diversidad alfa de ASVs según el método de extracción; b)- diversidad alfa de ASVs según el momento de muestreo. Observed = cantidad de ASVs detectados (riqueza). Shannon = índice de diversidad Shannon-Wiener. samplingDevice = método de muestreo. Sampling Point = momento de muestreo en torno al parto.

**Figura 7**

Diversidad alfa de ASVs por tratamiento



*Nota.* Observed = cantidad de ASVs detectados. Shannon = índice de diversidad Shannon-Wiener. Treatment = tratamiento (aditivo).

En la Figura 6, en el gráfico “a”, el box plot de la izquierda representa la cantidad de ASVs observados (riqueza) en las muestras por fístula (F) y por sonda (S). El promedio de ASVs encontrados según el método de extracción fue de 1491 para F y 1517 para S, y no se encontraron diferencias significativas según la prueba estadística Wilcoxon ( $W = 155$ ,  $p$ -valor = 0,9605).

El de la derecha representa el índice de diversidad de Shannon, el cual promedió 5,58 para F y 5,63 para S, no se observan diferencias significativas entre métodos a nivel de diversidad ( $W = 159$ ,  $p$ -valor = 0,8578). Esta información determina de que ambos métodos permiten captar la misma cantidad y diversidad de ASVs.

Estas observaciones son coincidentes con lo descrito por de Assis Lage et al. (2020) en vacas en lactación, los cuales muestrearon el contenido ruminal para evaluar la población microbiana a las 0, 2, 4, 6, 8, 12 horas postprandial mediante sonda (donde evitaron agregar partículas sólidas gracias a la inclusión de un filtro en el extremo) y fístula (mediante una muestra compuesta del retículo, zona ventral, y dos tomas de la fase sólida), encontrando que el índice de diversidad de Shannon a nivel de ASVs no obtuvo diferencias significativas entre los métodos de muestreo. Por otro lado, estos autores encontraron que en el caso particular de la riqueza observada de ASVs y el perfil microbiano si existían diferencias en los momentos mayores a las 4 horas, pero no hubo diferencias en la muestra preprandial (0 hs) y posprandial temprana (2 y 4 hs), lo cual coincide con la metodología del presente trabajo ya que las muestras se tomaron preprandial de la pastura (0 hs) en el posparto y no presentan diferencias.

En el gráfico “b” de la Figura 6, la riqueza de ASVs observada en las muestras para cada momento de extracción promedió 2042 en -30, 1142 en +35, 1312 en +65. La riqueza presenta diferencias importantes entre el preparto y el posparto: -30 y +35 ( $W = 142$ ,  $p\text{-valor} = 2,958e^{-6}$ ), -30 y +65 ( $W = 132$ ,  $p\text{-valor} = 1,479e^{-6}$ ). Además, se encontró una leve diferencia entre las muestras posparto: +35 y +65 ( $W = 33,5$ ,  $p\text{-valor} = 0,04884$ ).

Por otro lado, el índice de Shannon promedió 6,58 en -30, 4,98 en +35, 5,23 en +65, demostrando una mayor diversidad en el preparto ( $W = 144$ ,  $p\text{-valor} = 7,396e^{-7}$  entre -30 y +35;  $W = 132$ ,  $p\text{-valor} = 1,479e^{-6}$  entre -30 y +65), lo que indicaría que la población no solamente es diversa, sino que el aporte proporcional de cada ASV es más equitativo (más distribuidos en la muestra); mientras que en el posparto una menor cantidad de ASVs representan una mayor proporción de la muestra, y no hay diferencias significativas entre +35 y +65 ( $W = 45$ ,  $p\text{-valor} = 0,2115$ ).

En la Figura 7, la riqueza de ASVs observada en las muestras para tratamiento promedió 1443 para extracto de plantas, 1642 para monensina, 1414 para el control. No existe diferencia significativa en la riqueza de ASVs entre los aditivos utilizados: extracto de plantas y monensina ( $W = 62$ ,  $p\text{-valor} = 0,274$ ), extracto de plantas y control ( $W = 59,5$ ,  $p\text{-valor} = 0,8501$ ), control y monensina ( $W = 37$ ,  $p\text{-valor} = 0,2469$ ).

A nivel del índice de diversidad, los tratamientos promediaron 5,64 para extracto de plantas, 5,62 para monensina, 5,53 para el control. Tampoco existe diferencia significativa entre la diversidad encontrada a nivel de ASVs entre los aditivos utilizados: extracto de plantas y monensina ( $W = 80$ ,  $p\text{-valor} = 0,8596$ ), extracto de plantas y control ( $W = 68$ ,  $p\text{-valor} = 0,7813$ ), control y monensina ( $W = 52$ ,  $p\text{-valor} = 0,917$ ).

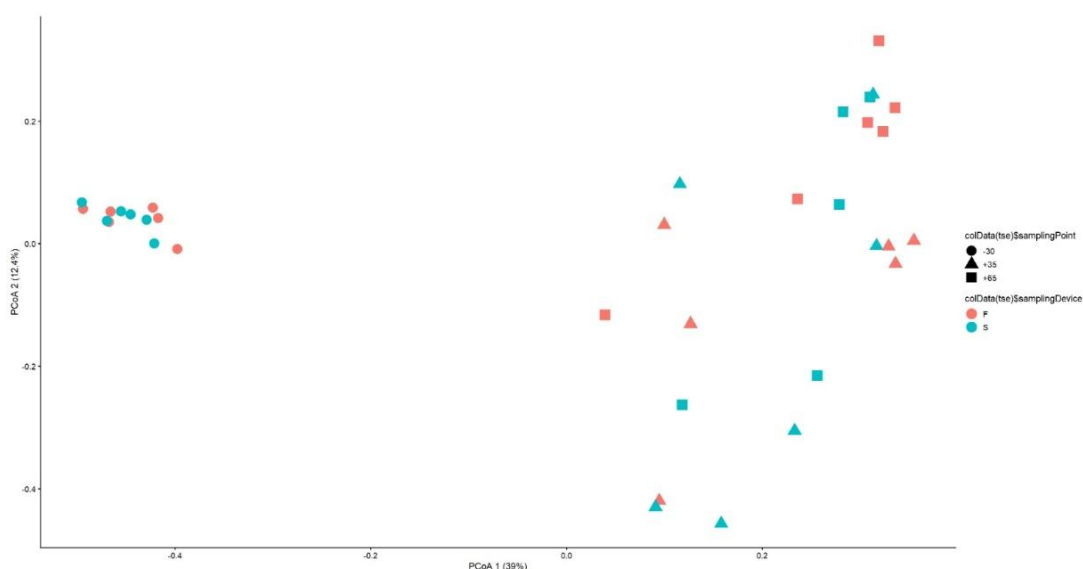
#### **4.6 Análisis de coordenadas principales (PCoA) a nivel de ASVs una vez aplicado el primer filtro**

La PCoA es un método estadístico que permite unificar datos que se generan por muchas variables. Permite visualizar gráficamente en dos o tres dimensiones datos que están explicados por multivariantes. En este caso de ecología microbiana, donde los perfiles de microorganismos están determinados por muchos factores (momento de muestreo, método de muestreo, tratamientos, factores intrínsecos individuales, otros factores ambientales y metodológicos), la PCoA es una herramienta clave para visualizar de manera simple la mayor variabilidad detectable. La PCoA consta en este caso de dos ejes (bidimensional), los cuales intentan capturar la máxima variabilidad y ubicar los datos en el espacio de forma tal que la distancia entre los

datos determina el grado de similitud (o disimilitud), por lo que cuanto más cercanos en el espacio sean dos datos más similares son entre ellos (*Principal component analysis (PCA)*, 2025).

A continuación, se presentan dos gráficos de Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), que difieren en los factores utilizados para agrupar las muestras. Ambos gráficos representan las mismas unidades (ASVs), permitiendo evaluar el grado de similitud entre las muestras. En el primer gráfico (Figura 8), las muestras están diferenciadas según el momento y el método de muestreo, mientras que en el segundo (Figura 9) se distinguen según el momento de muestreo y por vaca.

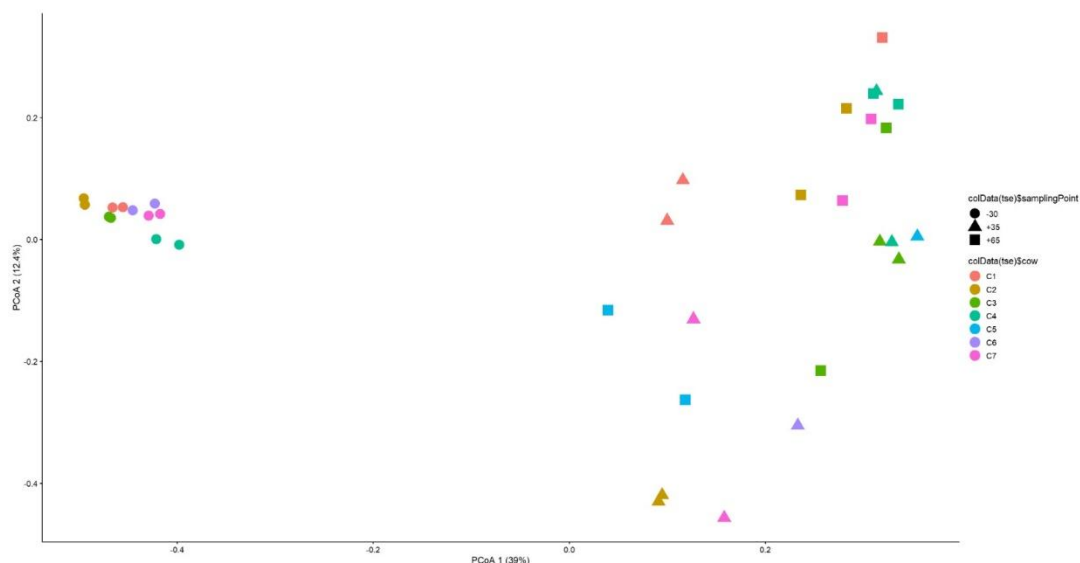
**Figura 8**  
*Análisis de PCoA a nivel de ASVs*



*Nota.* `colData(tse)$samplingPoint` = momento de muestreo desde el parto.

`colData(tse)$samplingDevice` = método de muestreo.

**Figura 9**  
Análisis de PCoA a nivel de ASVs



*Nota.* colData(tse)\$samplingPoint = momento de muestreo desde el parto. colData(tse)\$cow = vaca

Por construcción, el eje PCoA 1, representa el componente que explica el mayor porcentaje de la variación de los datos, siendo este caso de un 39%. Este eje, a su vez, se correlaciona claramente con el momento de la extracción, pre- y postparto. Se observan dos grupos, los que se encuentran a la izquierda de la gráfica y representan al momento de extracción -30 días, y los que se encuentran a la derecha del gráfico y representan los momentos de extracción +35 y +65 días. La disimilitud entre los ASVs es clara entre el momento preparto (representados con círculos) y posparto (representado con triángulos y cuadrados), y esto es muy probable que se deba fundamentalmente a la dieta.

El eje PCoA 2 explica un 12,4% de la variación total, pero no resulta clara su asociación con ninguno de los factores previamente mencionados, apenas una leve tendencia al separar por método de muestreo.

Cuando se contrastan ambos métodos para una misma vaca en un momento dado (gracias al análisis de ambos gráficos), se observa que, en general, la variabilidad entre los métodos es mínima. Esto se evidencia al notar que las muestras obtenidas mediante fistula y sonda para la misma vaca suelen estar muy próximas entre sí en el espacio del gráfico (esta señal es más notoria en las muestras preparto). Además, no se observa un agrupamiento claro según el método de extracción, lo que demuestra que ambos métodos ofrecen señales precisas sobre la diversidad de ASVs. Pese a esto, en algún caso la separación entre muestras del mismo animal y en el mismo momento por los dos métodos considerados es relativamente importante, lo que

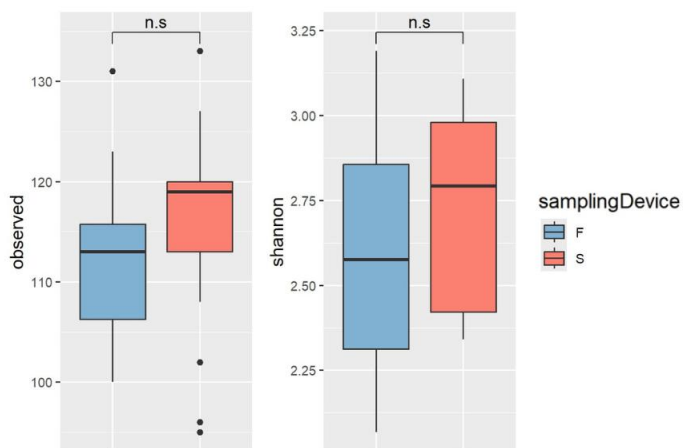
podría ser causado por diferencias reales entre métodos para algunos animales, así como a efectos aleatorios no modelados.

#### 4.7 Diversidad alfa a nivel de géneros para tres grupos de variación una vez aplicado el primer filtro

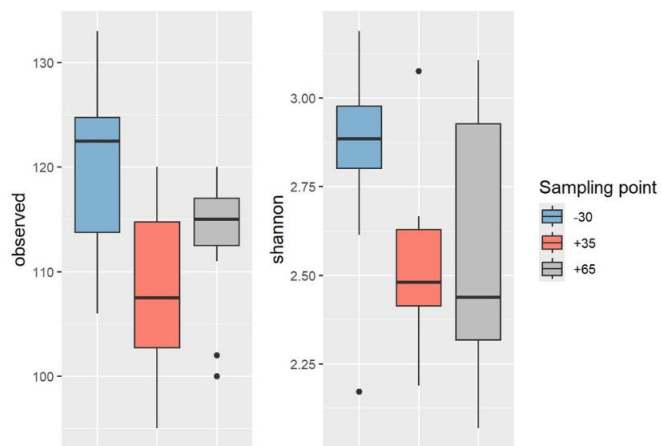
**Figura 10**

*Diversidad alfa de géneros para método de muestreo y momento de muestreo*

a)-



b)-

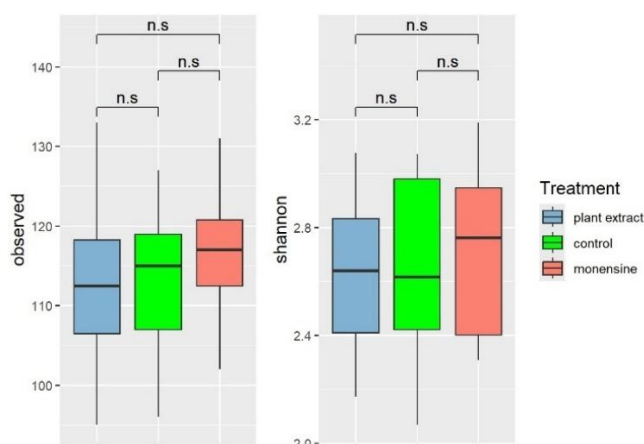


*Nota.* a)- Diversidad alfa de géneros según el método de extracción; b)- diversidad alfa de géneros según el momento de muestreo. Observed = cantidad de géneros detectados.

Shannon = índice de diversidad Shannon-Wiener. samplingDevice = método de muestreo.

Sampling Point = momento de muestreo en torno al parto.



**Figura 11***Diversidad alfa por tratamientos*

*Nota.* Diversidad alfa de géneros para los tratamientos de adición de aditivos. Observed = cantidad de géneros detectados. Shannon = índice de diversidad Shannon-Wiener. Treatment = tratamiento (aditivo).

En la Figura 10, el gráfico “a”, el box plot de la izquierda representa la riqueza de géneros observada en las muestras por fístula (F) y por sonda (S). Los géneros promediaron 112 por F y 116 por S. La riqueza no presenta diferencias significativas en los métodos de extracción ( $W = 106$ ,  $p\text{-valor} = 0,1242$ ), esencialmente por la dispersión entre muestras, aunque se observa una leve tendencia de mayor riqueza en sonda respecto a fístula.

El índice de diversidad (box plot de la derecha) no presenta diferencias significativas ( $W = 103$ ,  $p\text{-valor} = 0,1028$ ), aunque se aprecia la misma tendencia, ya que F promedió 2,57 y S promedió 2,75.

Juntando ambas observaciones, se puede decir que en principio (en términos estadísticos) ambos métodos permiten captar las mismas proporciones de distintos géneros.

En la Figura 10, en el gráfico “b”, el box plot de la izquierda representa la riqueza de géneros observada en las muestras para cada momento de extracción, los cuales promediaron 121 para -30, 108 en +35, 113 en +65. Existe fuerte diferencia significativa en los géneros logrados entre el pre- y posparto temprano: entre -30 y +35 ( $W = 124,5$ ,  $p\text{-valor} = 0,002652$ ). También, diferencia significativa (aunque menor) entre el pre- y posparto tardío: -30 y +65 ( $W = 99,5$ ,  $p\text{-valor} = 0,0419$ ). Esta tendencia al aumento de la riqueza en +65 puede deberse a la adaptación lograda luego del evento crítico de la transición. No se encontró diferencia significativa entre +35 y +65 ( $W = 43,5$ ,  $p\text{-valor} = 0,1745$ ).

Los valores de índice de diversidad de Shannon promediaron 2,83 para -30, 2,53 en +35, 2,59 en +65. Se observa un mayor índice de diversidad en el preparto respecto al posparto temprano: entre -30 y +35 ( $W = 119$ ,  $p\text{-valor} = 0,00556$ ). Se observa una tendencia a recuperar diversidad en posparto tardío, y no se encuentran diferencias significativas respecto al preparto: entre -30 y +65 ( $W = 88$ ,  $p\text{-valor} = 0,1896$ ). Esto indicaría que en el preparto la población no solamente es diversa, sino que el aporte proporcional de cada género es más equitativo, mientras que en el posparto una menor cantidad de géneros representan una mayor proporción de la muestra, aunque en el posparto tardío esa diferencia no sea tan notoria. No hay diferencias significativas entre las muestras posparto ( $W = 65$ ,  $p\text{-valor} = 0,9759$ ).

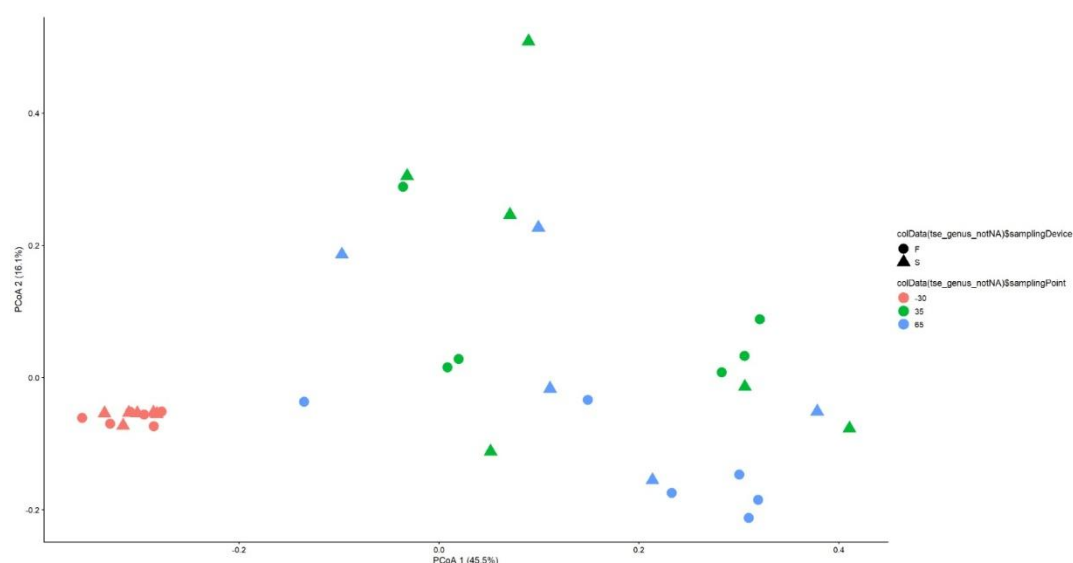
En la Figura 11, la riqueza de géneros por tratamiento promedió 113 con extracto de plantas, 116 con monensina, 113 con el control. No existe diferencia significativa en la riqueza de géneros según el aditivo utilizado: extracto de plantas y monensina ( $W = 61$ ,  $p\text{-valor} = 0,2462$ ), extracto de plantas y control ( $W = 56$ ,  $p\text{-valor} = 0,682$ ), control y monensina ( $W = 44,5$ ,  $p\text{-valor} = 0,5211$ ).

El índice de Shannon promedió 2,59 con extracto de plantas, 2,72 con monensina, 2,66 con el control. No existe diferencia significativa entre la diversidad encontrada a nivel de géneros entre los aditivos utilizados: extracto de plantas y monensina ( $W = 65$ ,  $p\text{-valor} = 0,3474$ ), extracto de plantas y control ( $W = 54$ ,  $p\text{-valor} = 0,5995$ ), control y monensina ( $W = 51$ ,  $p\text{-valor} = 0,8621$ ).

#### 4.8 PCoA a nivel de géneros una vez aplicado el primer filtro

**Figura 12**

*Análisis de PCoA para los factores momento de extracción y método de extracción*



*Nota.* `colData(tse_genus_notNA)$samplingDevice` = método de muestreo.

`colData(tse_genus_notNA)$samplingPoint` = momento de muestreo en torno al parto.

Al igual que se adelantaba en el PCoA a nivel de ASVs, se observan dos grupos claros: a la izquierda un grupo determinado por el momento de extracción -30, poco disperso y por lo tanto con una alta similitud entre los géneros logrados; y a la derecha y centro del gráfico, una nube de puntos dispersa (alta disimilitud) representadas por el momento de extracción +35 y +65. Es altamente probable que estas diferencias se deban fundamentalmente a la dieta.

#### **4.9 Principales géneros detectados en cada momento de muestreo una vez aplicado el segundo filtro**

A partir del primer filtrado, donde se trabajó con 8000 ASVs correspondientes a 376 géneros microbianos, se aplicó un segundo filtro por abundancia y prevalencia. Para contribuir a entender las diferencias desde el punto de vista biológico, se seleccionaron únicamente los géneros presentes en al menos el 50% de las muestras de cada grupo (momento de muestreo) y con una abundancia relativa mínima del 0,1%. Este procedimiento permitió reducir el número de géneros de 376 a 73 (lo más prevalentes), distribuidos en 62 géneros en el día -30, 40 en +35 y 47 en +65. Con esta base se realizaron los análisis posteriores: determinación y dinámica del microbioma central, comparación general de abundancias, análisis de expresión diferencia, coeficientes de correlación Pearson y Spearman, análisis de redundancia, y evaluación del coeficiente de variación entre métodos de muestreo.

A continuación, se presenta una tabla con los géneros microbianos detectados en cada momento de muestreo, luego de aplicar el segundo filtro. Esta tabla presenta lo que aquí se ha considerado como el microbioma central, dominado por bacterias y alguna participación de arqueas, compuesto por los géneros que, en conjunto, representan aproximadamente el 80% de la población microbiana filtrada más prevalente en cada momento de extracción, promediando los resultados obtenidos por ambos métodos de muestreo.

**Tabla 10**

Microbioma central según géneros detectados en cada momento de muestreo

Preparto (-30)		Posparto (+35)		Posparto (+65)	
Género	(%)	Género	(%)	Género	(%)
<i>Prevotella</i>	30,4	<i>Prevotella</i>	23,5	<i>Prevotella</i>	21
<i>Methanobrevibacter</i>	12,8	<i>Prevotella_7</i>	17,2	<i>Prevotella_7</i>	18,6
<i>Christensenellaceae R-7 group</i>	10,2	<i>Sharpea</i>	15	<i>Succinivibrionaceae UCG-001</i>	14,5
<i>NK4A214 group</i>	5,6	<i>Bifidobacterium</i>	5,1	<i>Acetitomaculum</i>	4,4
<i>Rikenellaceae RC9 gut group</i>	4,7	<i>Acetitomaculum</i>	5,1	<i>Sharpea</i>	4,1
<i>Ruminococcus</i>	2,7	<i>Succinivibrionaceae UCG-001</i>	4,3	<i>Lachnospiraceae NK3A20 group</i>	3,5
<i>Prevotellaceae UCG-001</i>	2,5	<i>Shuttleworthia</i>	2,4	<i>Ruminococcus</i>	3,1
<i>Lachnospiraceae NK3A20 group</i>	2,2	<i>Lachnospiraceae NK3A20 group</i>	2,1	<i>Bifidobacterium</i>	2,7
<i>Butyrivibrio</i>	2,1	<i>Erysipelotrichaceae UCG-002</i>	2,1	<i>Shuttleworthia</i>	2,2
<i>Pseudobutyrvibrio</i>	1,7	<i>Methanobrevibacter</i>	1,6	<i>Oribacterium</i>	2,2
<i>Selenomonas</i>	1,4	<i>Prevotellaceae UCG-001</i>	1,6	<i>Methanobrevibacter</i>	1,9
<i>Prevotellaceae UCG-003</i>	1,2			<i>Christensenellaceae R-7 group</i>	1,9
<i>Olsenella</i>	1,2				
<i>Succiniclasticum</i>	1,1				
<i>Acetitomaculum</i>	1,1				
Total	80,9		80,0		80,1

Resulta interesante rescatar primeramente que con sólo los tres géneros más frecuentes se logra superar el 50% de la abundancia.

A continuación, se comentan los géneros del microbioma central detectado:

Es de destacar la presencia del género *Prevotella*, el cual aparece en las mayores proporciones en los tres momentos de muestreo, lo que demuestra que es un género muy difundido a nivel ruminal incluso ante diferencias contrastantes en la dieta. *Prevotella* son bacterias anaerobias estrictas, gram negativas, consideradas sacarolíticas y que metabolizan diversos sustratos desde hemicelulosa a azúcares y hasta proteínas, lo cual puede explicar su aparición tan abundante, siendo su producto de fermentación principal el propionato (Betancur-Murillo et al., 2023).

En el momento de extracción -30 se destacan los géneros *Prevotella*, *Methanobrevibacter*, y *Christensenellaceae R-7 group*. Estas representan poco más del 53% de la abundancia. *Methanobrevibacter* son arqueos que utilizan  $H^+$  y  $CO_2$  y se caracterizan por generar metano (es metanógena), donde *M. ruminantium* son las especies de metanógenos más dominantes (Hook et al., 2010). Por otro lado, *Christensenellaceae R-7 group*, pertenecen a la clase *Clostridium*, y se ha reportado que producen propionato y butirato (Wang et al., 2023). También aparece en menor proporción el género *Acetivibrio* como grupo de bacterias que utilizan  $H^+$  y  $CO_2$  produciendo acetato a partir de dietas tanto altas como bajas en proporción de forraje, y la especie más reconocida es *A. ruminis*; además, es anaerobia obligada; fermenta formiato, glucosa, celobiosa, fructosa; y se ha visto que soporta bien un rango de pH de 6,4 a 7,3 (Greening & Leedle, 1989).

Los perfiles de los géneros microbianos resultaron con una mayor similitud entre los momentos +35 y +65, lo cual es esperable dado que en ambos casos las vacas recibieron la misma dieta. En el momento +35 se destacan *Prevotella*, *Prevotella\_7*, y *Sharpea*, sumando una abundancia del 55%; en el momento +65 se destacan *Prevotella*, *Prevotella\_7*, y *Succinivibrionaceae UCG-001*, y suman el 54%. Si se considera la suma de ambas “*Prevotella*”, estas explican aproximadamente el 40% de abundancia en el posparto, lo cual es muy relevante considerando que los géneros detectados bajo el segundo filtro fueron 40 y 47 en +35 y +65 respectivamente. *Prevotella\_7* es una de las 7 divisiones creadas para *Prevotella spp.*, las cuales se clasifican en grupos llamados “clados” (grupos de organismos que incluyen un ancestro en común y toda su descendencia, y que poseen secuencias genéticas similares) pero que no llegan a diferenciar en género, siendo estos grupos: *Prevotella* (Clado 1), *Hallella* (Clado 2), *Segatella* (Clado 3), *Hoylella* (Clado 4), *Leyella* (Clado 5), *Xylanibacter* (Clado 6) y *Palleniella* (Clado 7)

(Dueholm et al., 2024), esta clasificación se da a nivel de otros géneros asociados a diferentes códigos numéricos. La aparición de abundancias relativas elevadas de *Prevotella\_7* en el posparto sugieren que este Clado se relaciona a dietas con altas proporciones de concentrados, lo cual fue también reportado por Mu et al. (2022). Por otro lado, *Sharpea* es un género del cual hay poca información, pero se sabe que produce lactato como producto final de su fermentación a partir de carbohidratos solubles (Kumar et al., 2018). Los géneros *Succinivibrionaceae* UCG-001 (produce succinato, el cual puede ser convertido a propionato por bacterias como *Succiniclasticum*) y *Shuttleworthia* (fermentadora de almidón) toman participación sobre todo en el posparto, principalmente *Succinivibrionaceae* UCG-001 que está totalmente ausente en el preparto y aumenta en forma importante, principalmente en +65. Esto es coincidente con lo reportado por Mu et al. (2022), los cuales afirman que las muestras de líquido ruminal se enriquecen con estos géneros cuando la dieta posee alta proporción de concentrados.

En cuanto a la dinámica de *Methanobrevibacter*, aparece en alta proporción en el preparto (12,8%), pero su presencia disminuye aproximadamente siete veces en el posparto (1,75% promedio). Esta reducción podría estar asociada al descenso de pH ruminal entre ambos momentos fisiológicos, lo cual podría afectar las poblaciones de metanógenos, explicado por el descenso de la producción de metano a pH 6,5 e incluso cero producciones de metano a pH inferior a 6 como fue reportado por Van Kessel y Russell (1996). En concordancia, los metadatos relevados del proyecto que enmarcan este trabajo muestran que el pH ruminal de las vacas en +35 y +65 días posparto promedió 6,65 y 6,31 respectivamente a lo largo del día, con valores mínimos de 6,12 y 5,7 para +35 y +65 respectivamente (González-Chappe et al., 2025). Si bien no se dispone de registros de pH para el momento -30, cabe señalar que hasta esta etapa los animales consumieron exclusivamente pradera, y bajo esta condición de consumo se sabe que según Van Kessel y Russell (1996) y Van Soest (1994), el pH ruminal de animales consumiendo únicamente pasturas suele rondar los 6,7 a 6,9; valores similares fueron reportados en el trabajo final de grado de Coduri Pacheco et al. (2024) en novillos Hereford pastoreando sólo raigrás, donde el pH promedió 6,9.

*Oscillospiraceae* NK4A214 group (anteriormente denominado *Ruminococcaceae* NK4A214 group) que aparece aquí en el preparto con una abundancia de 5,6%, se ha correlacionado positivamente con el contenido de sólidos totales en leche de vacas lecheras (Liu et al., 2022). En cabras, *Lachnospiraceae* NK3A20 group (que aparece en los tres momentos de muestreo) y *Oscillospiraceae* NK4A214 group, mostraron correlación positiva con la ganancia media diaria y la expresión de genes vinculados a la función de barrera epitelial del rumen (Chen et al., 2024).

*Rikenellaceae RC9 gut group* es un género orientado en la digestión de la fibra, por lo que aparece en el microbioma ruminal central con dietas a base de forraje (lo que explica baja presencia en el posparto de las vacas de este trabajo), además, su abundancia se asocia positivamente con parámetros como el pH ruminal, relación acetato/butirato, e incluso con el mejor desarrollo epitelial del rumen, y negativamente con el aumento en los niveles de propionato (Qiu et al., 2022).

*Bifidobacterium* aparece en el posparto (principalmente en +35 con una abundancia del 5,1%). Se sabe que este género utiliza diversas sustancias como fuente de alimento (azúcares simples, almidón, y carbohidratos estructurales), y que además se adapta al trabajo conjunto de degradación con otro tipo de bacterias (alimentación cruzada), y genera como producto principales acetato y lactato (Xiao et al., 2024).

*Ruminococcus* es un género importante a nivel ruminal, y si bien aparece como parte del microbioma central de estas vacas en -30 y +65, lo cierto es que incluso está presente en +35. Esto demuestra su difusión en el ambiente ruminal, aunque no aparezca en muy alta abundancia. Desempeña un rol central en la degradación de los carbohidratos de la pared celular (especialmente de la celulosa), lo que lo convierte en uno de los miembros más dominantes y funcionales, capaces de secretar diversas enzimas hidrolíticas dando lugar a la producción de AGV (Christopherson et al., 2014; Yeoman et al., 2021).

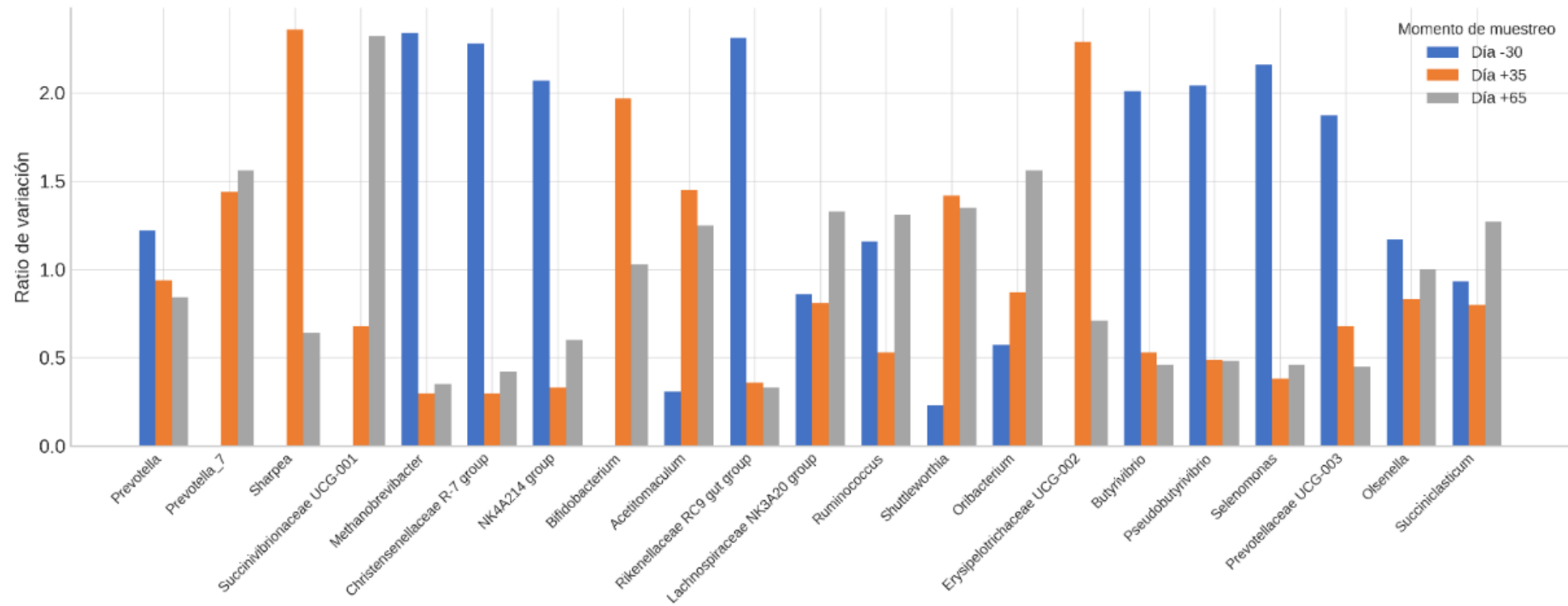
Perteneciente a la familia *Lachnospiraceae* se encuentran *Butyrivibrio* y *Pseudobutyrvibrio*, y se presentan en una abundancia del 2% en el microbioma central del preparto (su abundancia es menor al 0,6% en el posparto). No se conoce con exactitud la función de estos géneros a nivel ruminal, pero se sabe que están estrechamente ligados al metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos, donde principalmente descomponen polisacáridos complejos (celulosa, hemicelulosa) y los azúcares simples resultantes son fermentados a butirato (Pidcock et al., 2021).

*Selenomonas* y *Olsenella* aparece formando parte del microbioma central en el preparto en baja proporción. La especie *Selenomona ruminantium* es la más difundida a nivel ruminal, y se caracteriza por utilizar diversos sustratos solubles (como glucosa) los cuales fermenta a lactato, propionato, acetato y CO<sub>2</sub> (Bryant, 1956). Por otra parte, *Olsenella* a priori es un género de acción fibrolítica, pero no se ha recolectado tanta evidencia para afirmarlo, además la información disponible parece reducida.

A continuación, se presenta un gráfico que permite apreciar la variación del microbioma central (géneros centrales).

**Figura 13**

*Ratio de variación respecto al promedio general de cada género del microbioma central*





#### **4.10 Comparación general de las abundancias de los distintos géneros según el método de muestreo (sonda vs fístula) una vez aplicado el segundo filtro**

En este apartado se abordará la temática central de este trabajo, contrastando las abundancias de los géneros microbianos filtrados entre los métodos de muestreo. A continuación, se presenta una tabla con los porcentajes de abundancia de los géneros microbianos según el método y el momento de muestreo.

**Tabla 11**

*Abundancia de géneros microbianos según método de muestreo para los momentos de toma de muestra*

Géneros microbianos	Preparto (-30)		Posparto (+35)		Posparto (+65)	
	Fístula	Sonda	Fístula	Sonda	Fístula	Sonda
<i>Acetitomaculum</i>	1	1,1	3,7	6,4	2,5	6,3
<i>Amnripila</i>	0,1	0,1	0	0	0	0
<i>Anaerovibrio</i>	0,2	0,3	0	0	0	0
<i>Anaerovorax</i>	0,3	0,3	0	0	0	0
<i>Atopobium</i>	0,1	0,1	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	0	0	4,1	6,2	0,9	4,4
<i>Blautia</i>	0,4	0,5	0	0	0	0
<i>Butyrivibrio</i>	1,9	2,2	0,5	0,6	0,3	0,6
<i>Candidatus Saccharimonas</i>	0,2	0,2	0	0	0	0
<i>Christensenellaceae R-7 group</i>	10,4	10	1,4	1,3	1,3	2,5
<i>Colidextribacter</i>	0,1	0,2	0	0	0,1	0,1
<i>Coprococcus</i>	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<i>Defluviitaleaceae UCG-011</i>	0,1	0,1	0	0	0	0
<i>Desulfovibrio</i>	0,2	0,2	0	0	0	0
<i>[Eubacterium] hallii group</i>	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4
<i>[Eubacterium] nodatum group</i>	0,2	0,2	0	0	0,1	0,2
<i>[Eubacterium] ruminantium group</i>	0,5	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6
<i>[Eubacterium] ventriosum group</i>	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,4
<i>[Eubacterium] xylanophilum group</i>	0,1	0,2	0	0	0	0
<b>Eubacterium TOTAL</b>	<b>1,4</b>	<b>1,6</b>	<b>1,2</b>	<b>0,9</b>	<b>1,1</b>	<b>1,6</b>
<i>Erysipelotrichaceae UCG-002</i>	0	0	2,2	2,1	0,3	1
<i>Family XIII AD3011 group</i>	0,5	0,5	0	0	0,1	0,2
<i>Family XIII UCG-001</i>	0,2	0,2	0	0	0	0
<i>FD2005</i>	0,5	0,5	0,2	0,2	0,2	0,2
<i>Fibrobacter</i>	0,5	0,5	0	0	0	0
<i>Lachnospiraceae AC2044 group</i>	0,9	1,1	0,2	0,2	0,2	0,2
<i>Lachnospiraceae ND3007 group</i>	0,2	0,2	0	0	0	0
<i>Lachnospiraceae NK3A20 group</i>	2,1	2,3	1,8	2,4	2	5
<i>Lachnospiraceae NK4A136 group</i>	0,3	0,4	0	0	0	0
<i>Lachnospiraceae UCG-002</i>	0,1	0,1	0	0	0	0
<i>Lachnospiraceae UCG-008</i>	0,2	0,1	0	0	0	0
<i>Lachnospiraceae XPB1014 group</i>	0,8	1,1	0	0	0,1	0,1
<b>Lachnospiraceae TOTAL</b>	<b>4,6</b>	<b>5,3</b>	<b>2</b>	<b>2,6</b>	<b>2,3</b>	<b>5,3</b>
<i>Marvinbryantia</i>	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,4
<i>Methanobrevibacter</i>	12,8	12,7	1,5	1,8	1,4	2,4
<i>Methanosphaera</i>	0,7	0,7	0	0	0,1	0,2
<i>Mogibacterium</i>	0,3	0,2	0	0	0	0
<i>Monoglobus</i>	0,6	0,5	0	0	0	0
<i>Moryella</i>	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3
<i>NK4A214 group</i>	5,6	5,5	1	0,7	1,2	2

Géneros microbianos	Preparto (-30)		Posparto (+35)		Posparto (+65)	
	Fístula	Sonda	Fístula	Sonda	Fístula	Sonda
<i>Olsenella</i>	0,8	1,5	0,6	1	0,4	1,6
<i>Oribacterium</i>	0,8	0,8	1	1,4	2,2	2,2
<i>Papillibacter</i>	0,4	0,4	0	0	0	0
<i>Prevotella</i>	31,9	29	24,9	22,1	25,7	16,3
<i>Prevotella_7</i>	0	0	19,3	15,1	24,7	12,5
<i>Prevotellaceae Ga6A1 group</i>	0	0	0,7	0,3	0,4	0,1
<i>Prevotellaceae NK3B31 group</i>	0,4	0,4	0	0	0	0
<i>Prevotellaceae UCG-001</i>	2,6	2,5	2	1,1	1,2	0,9
<i>Prevotellaceae UCG-003</i>	1,3	1	0,5	0,3	0,3	0,2
<i>Prevotellaceae UCG-004</i>	0,1	0,2	0	0	0,1	0,1
<i>Prevotellaceae YAB2003 group</i>	0,1	0,1	0,4	0,5	0,4	0,3
<b><i>Prevotella</i> TOTAL</b>	<b>36,4</b>	<b>33,2</b>	<b>47,8</b>	<b>39,4</b>	<b>52,8</b>	<b>30,4</b>
<i>probable genus 10</i>	0,1	0,2	0	0	0	0
<i>Pseudobutyrvibrio</i>	1,6	1,8	0,4	0,4	0,4	0,4
<i>Pseudoscardovia</i>	0	0	0,7	0,3	0,4	1,1
<i>Rikenellaceae RC9 gut group</i>	5,2	4,3	0,9	0,5	0,7	0,7
<i>Roseburia</i>	0,2	0,3	0	0	0	0
<i>Ruminobacter</i>	0	0	0	0	0,5	0,1
<i>Ruminococcus</i>	2,3	3,1	1,5	1	2,5	3,7
<i>[Ruminococcus] gauvreauii group</i>	0,4	0,4	0,7	0,8	0,6	1,4
<b><i>Ruminococcus</i> TOTAL</b>	<b>2,7</b>	<b>3,5</b>	<b>2,2</b>	<b>1,8</b>	<b>3,1</b>	<b>5,1</b>
<i>Saccharofermentans</i>	1	0,9	0,2	0,1	0,2	0,3
<i>Schwartzia</i>	0,1	0,1	0	0	0	0
<i>Selenomonas</i>	1,4	1,4	0,2	0,3	0,3	0,3
<i>Sharpea</i>	0	0	13,1	17	2,3	5,9
<i>Shuttleworthia</i>	0,4	0,4	2,1	2,6	1,4	3,1
<i>Succiniclasticum</i>	1	1,3	1	0,9	1,4	1,6
<i>Succinivibrio</i>	0	0	0,3	0,5	0	0
<i>Succinivibrionaceae UCG-001</i>	0	0	4	4,6	15,7	13,4
<i>Succinivibrionaceae UCG-002</i>	0	0	0	0	0,7	0,4
<b><i>Succinivibrio</i> TOTAL</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4,3</b>	<b>5,1</b>	<b>16,4</b>	<b>13,8</b>
<i>Syntrophococcus</i>	0	0	0,2	0,3	0,1	0,3
<i>Treponema</i>	0,2	0,6	0,2	0,3	0,3	0,2
<i>UCG-001</i>	0,2	0,1	0,5	0,2	0,4	0,4
<i>UCG-002</i>	0,2	0,2	0	0	0	0
<i>UCG-004</i>	0,2	0,2	0	0	0	0
<i>UCG-005</i>	0,9	0,9	0	0	0,2	0,2
<b><i>UCG</i> TOTAL</b>	<b>1,5</b>	<b>1,4</b>	<b>0,5</b>	<b>0,2</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>
<i>Veillonellaceae UCG-001</i>	0,2	0,3	0	0	0	0
<b>Otros</b>	<b>2,8</b>	<b>3,5</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>4,1</b>	<b>4,4</b>

*Nota.* Valores expresados en porcentaje. Texto “en negrita” corresponde a la sumatoria de un grupo taxonómico.

Al igual que se observa en la Tabla 10, existen cambios en la composición microbiana en función del momento de muestreo.

La gran mayoría de los géneros muestran a priori una buena estimación de su abundancia en el método por sonda, sobre todo cuando su abundancia es alta, pero existen algunos casos donde al parecer se dan diferencias importantes, por ejemplo: *Bifidobacterium*, *Acetitomaculum* resultaron en abundancias mayores por sonda en el momento posparto y *Sharpea* sobre todo en el momento +65; *Prevotella* muestra en el momento +65 mayor

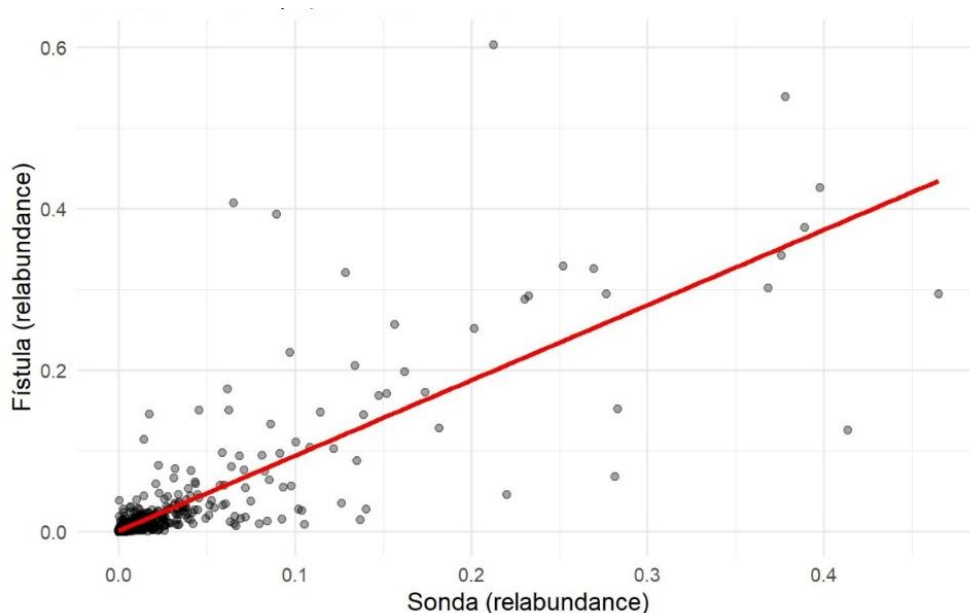
abundancia en el método por fístula. En este sentido, con el fin de cuantificar la relación entre las abundancias relativas de géneros según el método de muestreo se presentan las correlaciones de Pearson y Spearman.

#### 4.10 Correlación de Pearson y Spearman para los métodos de muestreo a nivel de géneros

A nivel global (analizando conjuntamente los tres momentos de muestreo), los valores de correlación de Pearson ( $r = 0,825$ ) y Spearman ( $r = 0,924$ ) para los métodos de muestreo son altos, mostrando una fuerte asociación entre los resultados obtenidos.

**Figura 14**

*Comparación global de abundancias relativas por género entre métodos de muestreo*



*Nota.* Valores expresados en proporciones decimales.

En el gráfico de la Figura 14, cada punto representa un género microbiano para una muestra determinada, que se ubica en el espacio según la abundancia relativa en la que aparece para cada método de muestreo. La recta ajustada con alta correlación indica una tendencia lineal positiva entre ambos métodos, aunque se observe que el comportamiento en la dispersión de los puntos aumenta a medida que aumenta su frecuencia.

Como ya se ha observado, la mayoría de los géneros son de baja abundancia relativa, lo que explica la mayor concentración de puntos en el origen del gráfico, y la mínima dispersión de estos puntos indica que la variación absoluta también es baja. Este comportamiento no solo es esperable, sino que además es deseable, ya que si ocurriera una dispersión elevada en esta zona (en comparación con la zona de géneros de mayor abundancia) podría sugerir diferencias en las metodologías de muestreo. En concordancia, a medida que aumenta la abundancia relativa de

los géneros, mayor es la dispersión de la nube de puntos, debido a que la variación absoluta de las abundancias relativas de géneros según el método de muestreo también es mayor.

Finalmente, una mayor correlación de Spearman respecto a Pearson determina que, aunque pueda existir una pequeña diferencia entre los valores absolutos de abundancias, el orden (o rangos de frecuencias) se mantiene entre los métodos cuando se consideran los tres momentos de muestreo simultáneamente.

Por otro lado, el análisis de correlación según el momento de muestreo arrojó los siguientes resultados:

**Tabla 12**

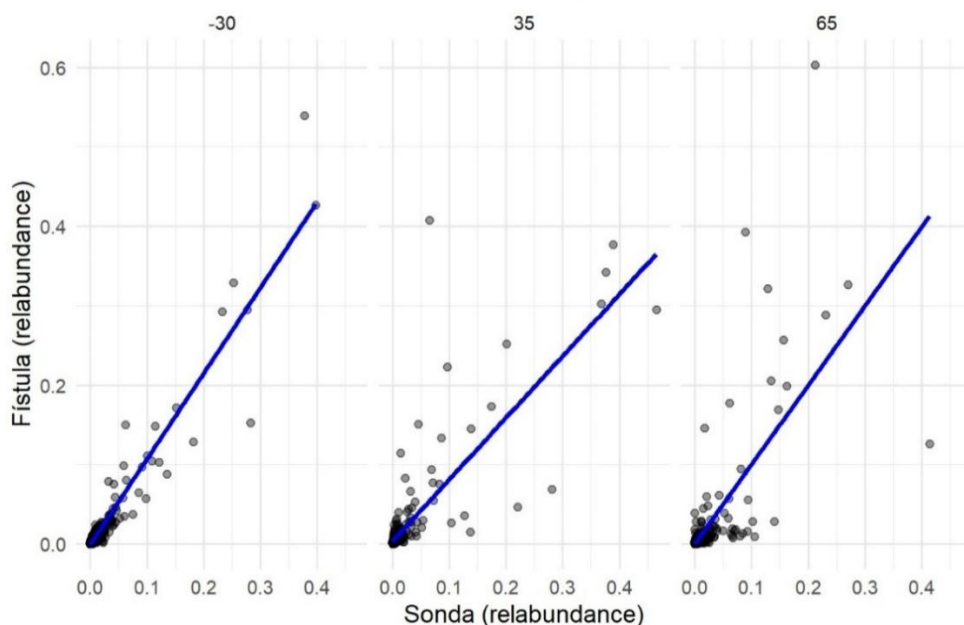
*Correlación media de Pearson y Spearman según el momento de muestreo para Fístula y Sonda*

Momento de muestreo	Pearson (r)	Spearman (r)
-30	0,961	0,869
35	0,812	0,824
65	0,766	0,706

Las correlaciones siguen siendo altas cuando se analizan por separado los momentos de muestreo, pero se observa una disminución de estas a medida que avanza el día de la muestra.

**Figura 15**

*Comparación de abundancias relativas de géneros por momento de muestro para los métodos de extracción*



*Nota.* Valores expresados en proporciones decimales.

Tal vez, los cambios fisiológicos entre momentos, como también el cambio en el tipo de dieta, sumado a la baja predictibilidad del lugar de muestreo de la sonda oro-ruminal, podría desembocar en la caída de los valores “r” tanto de Pearson como de Spearman, debido a un posible aumento en la concentración de partículas en la muestra lograda por sonda: por un lado, los cambios fisiológicos de la vaca determinan un cambio en el nivel de consumo, donde se sabe que éste es bajo en el parto y luego va en aumento hasta el mes cuatro (día +120 aproximadamente). Este incremento en el nivel de consumo al avanzar en el periodo experimental implica que el rumen se encuentre cada vez más lleno, lo que podría aparejar una mayor posibilidad de que la sonda arrastre partículas sólidas durante la extracción de líquido, incurriendo en un sesgo mayor del perfil microbiano respecto al muestreo por fístula. Por otro lado, pasar de una dieta totalmente forrajera a una dieta con inclusión de concentrados y forrajes de mejor calidad, modifica el perfil de microorganismos. Esta modificación del microbioma podría ocurrir a nivel de la fase sólida y líquida, al pensar que en el parto las poblaciones podrían ser de mayor similitud entre las fases y que en el posparto podría darse una diferenciación de los perfiles microbianos entre fases debido a la necesidad de fermentar mayor cantidad de carbohidratos no estructurales. Por lo tanto, bajo esta hipótesis, el hecho de incurrir en una mayor posibilidad de obtener restos sólidos en la muestra por sonda podría determinar mayores diferencias entre métodos, influyendo sobre la correlación lograda al avanzar en el periodo experimental.

Para avanzar en la respuesta de estas hipótesis sería necesario conocer la proporción de fase sólida que fue incluida en la muestra tanto por fístula como por sonda en cada momento de muestreo, además evaluar los perfiles microbianos obtenidos en ambas fases ante el cambio en la dieta y el momento fisiológico.

#### 4.11 Análisis de expresión diferencial de géneros una vez aplicado el segundo filtro

**Tabla 13**

*Análisis de expresión diferencial de géneros según el método de muestreo*

Género	Expresión diferencial				
	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	pvalue	padj
<i>Olsenella</i>	844,5	-0,3418	0,2472	0,0026	0,1495
<i>Prevotellaceae UCG-003</i>	446,7	0,3705	0,1774	0,0040	0,1495
<i>Bifidobacterium</i>	2262,5	-0,2562	0,2455	0,0125	0,2311
<i>UCG-001</i>	240,8	0,3117	0,2266	0,0107	0,2311
<i>Lachnospiraceae NK3A20 group</i>	2136,0	-0,3037	0,2057	0,0176	0,2605
<i>Rikenellaceae RC9 gut group</i>	1413,5	0,2514	0,1568	0,0403	0,2985
<i>[Ruminococcus] gauvreauii group</i>	688,0	-0,2659	0,1962	0,0375	0,2985
<i>Acetitomaculum</i>	3377,7	-0,2721	0,2177	0,0270	0,2985
<i>Moryella</i>	167,2	-0,2418	0,2256	0,0389	0,2985
<i>Syntrophococcus</i>	190,0	-0,2241	0,2379	0,0343	0,2985
<i>Prevotellaceae Ga6A1 group</i>	205,4	0,1607	0,2482	0,0547	0,3051
<i>Butyrivibrio</i>	701,2	-0,2165	0,1363	0,0577	0,3051
<i>Marvinbryantia</i>	149,5	-0,2135	0,2310	0,0543	0,3051
<i>Shuttleworthia</i>	1967,3	-0,2415	0,2029	0,0553	0,3051
<i>Sharpea</i>	6203,4	-0,2194	0,2207	0,0637	0,3140
<i>Coprococcus</i>	167,0	-0,2279	0,1737	0,0717	0,3315
<i>Prevotellaceae UCG-001</i>	1272,4	0,2195	0,1707	0,0814	0,3480
<i>Oribacterium</i>	1399,2	-0,2125	0,2090	0,0846	0,3480
<i>Erysipelotrichaceae UCG-002</i>	878,1	-0,1718	0,2347	0,0974	0,3793
<i>Prevotella</i>	19940,1	0,1962	0,1722	0,1194	0,4419
<i>Roseburia</i>	41,9	-0,1515	0,2245	0,1743	0,6141
<i>Family XIII AD3011 group</i>	149,1	-0,1610	0,1911	0,2013	0,6771
<i>Christensenellaceae R-7 group</i>	2962,8	-0,1462	0,1774	0,2464	0,7294
<i>UCG-005</i>	223,3	-0,1463	0,1987	0,2393	0,7294
<i>Anaerovibrio</i>	52,4	-0,1320	0,2249	0,2306	0,7294
<i>Methanosphaera</i>	178,3	-0,1130	0,2328	0,2630	0,7484
<i>Prevotellaceae UCG-004</i>	63,2	-0,1328	0,1887	0,2913	0,7702
<i>[Eubacterium] nodatum group</i>	88,7	-0,1324	0,1917	0,2914	0,7702
<i>[Eubacterium] xylanophilum group</i>	30,1	-0,0965	0,2332	0,3316	0,8283
<i>probable genus 10</i>	34,1	-0,1004	0,2291	0,3358	0,8283
<i>Methanobrevibacter</i>	3845,1	-0,0744	0,2233	0,4947	0,8959
<i>Pseudoscardovia</i>	338,1	-0,0536	0,2345	0,5748	0,8959
<i>Atopobium</i>	23,4	-0,0645	0,2434	0,4271	0,8959
<i>Prevotella_7</i>	15328,0	0,0404	0,2370	0,6583	0,8959
<i>Prevotellaceae NK3B31 group</i>	81,1	-0,0505	0,2271	0,6289	0,8959
<i>Prevotellaceae YAB2003 group</i>	249,5	0,0448	0,2013	0,7135	0,8959
<i>Desulfovibrio</i>	36,8	-0,0502	0,2359	0,5907	0,8959

Género	Expresión diferencial				
	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	pvalue	padj
<i>UCG-004</i>	40,6	0,0442	0,2405	0,6053	0,8959
<i>[Eubacterium] hallii group</i>	219,4	-0,1030	0,1822	0,4133	0,8959
<i>[Eubacterium] ruminantium group</i>	440,8	-0,0716	0,1848	0,5685	0,8959
<i>[Eubacterium] ventriosum group</i>	206,9	0,0469	0,1934	0,7060	0,8959
<i>Blautia</i>	86,0	-0,0319	0,2481	0,6424	0,8959
<i>FD2005</i>	224,0	-0,0649	0,1359	0,5684	0,8959
<i>Lachnospiraceae NK4A136 group</i>	63,7	-0,0367	0,2322	0,7081	0,8959
<i>Lachnospiraceae XPB1014 group</i>	208,1	-0,0607	0,2047	0,6155	0,8959
<i>Pseudobutyrvibrio</i>	583,0	-0,0566	0,1448	0,6310	0,8959
<i>Monoglobus</i>	113,1	0,0579	0,2344	0,5463	0,8959
<i>Saccharofermentans</i>	329,1	0,0474	0,1528	0,6946	0,8959
<i>NK4A214 group</i>	1853,0	-0,1032	0,1642	0,4055	0,8959
<i>Papillibacter</i>	79,5	-0,0318	0,2352	0,7350	0,8959
<i>Ruminococcus</i>	1693,9	-0,0468	0,1645	0,7062	0,8959
<i>Amnipila</i>	19,9	-0,0353	0,2369	0,6990	0,8959
<i>Anaerovorax</i>	67,7	-0,0340	0,2284	0,7406	0,8959
<i>Family XIII UCG-001</i>	38,7	-0,0254	0,2483	0,7082	0,8959
<i>Mogibacterium</i>	45,0	0,0445	0,2356	0,6341	0,8959
<i>Schwartzia</i>	28,6	-0,0324	0,2292	0,7504	0,8959
<i>Veillonellaceae UCG-001</i>	53,2	-0,0786	0,2307	0,4386	0,8959
<i>Candidatus Saccharimonas</i>	40,3	0,0300	0,2358	0,7469	0,8959
<i>Succinivibrio</i>	159,7	-0,0223	0,2474	0,7507	0,8959
<i>Succinivibrionaceae UCG-001</i>	6589,3	-0,0214	0,2491	0,7429	0,8959
<i>Treponema</i>	219,6	-0,0385	0,2259	0,7154	0,8959
<i>Other</i>	3740,4	-0,0953	0,1609	0,4396	0,8959
<i>Lachnospiraceae ND3007 group</i>	37,3	-0,0283	0,2291	0,7809	0,9029
<i>Selenomonas</i>	451,3	0,0361	0,1866	0,7732	0,9029
<i>Fibrobacter</i>	94,8	0,0141	0,2404	0,8686	0,9228
<i>Defluviitaleaceae UCG-011</i>	25,9	-0,0152	0,2488	0,8185	0,9228
<i>Lachnospiraceae AC2044 group</i>	299,3	-0,0189	0,1710	0,8801	0,9228
<i>Lachnospiraceae UCG-002</i>	21,2	-0,0094	0,2525	0,8621	0,9228
<i>UCG-002</i>	46,3	-0,0161	0,2193	0,8853	0,9228
<i>Succiniclasticum</i>	921,8	0,0209	0,1986	0,8650	0,9228
<i>Ruminobacter</i>	97,9	0,0088	0,2549	0,8435	0,9228
<i>Colidextribacter</i>	55,1	-0,0117	0,2242	0,9131	0,9385
<i>Lachnospiraceae UCG-008</i>	29,2	-0,0051	0,2422	0,9496	0,9496
<i>Succinivibrionaceae UCG-002</i>	172,2	0,0027	0,2564	0,9422	0,9496

*Nota.* baseMean: promedio general de abundancia absoluta. Log2Foldchange: logaritmo en base 2 del cociente entre las abundancias medias sonda/fístula. lfcSE: error estándar del log2FoldChange. pvalue: p-valor. padj: p-valor ajustado.

En la tabla se observa el análisis de expresión diferencial de géneros según el método de extracción, esto permite comparar la abundancia relativa de los mismos según extracción por sonda o fístula.

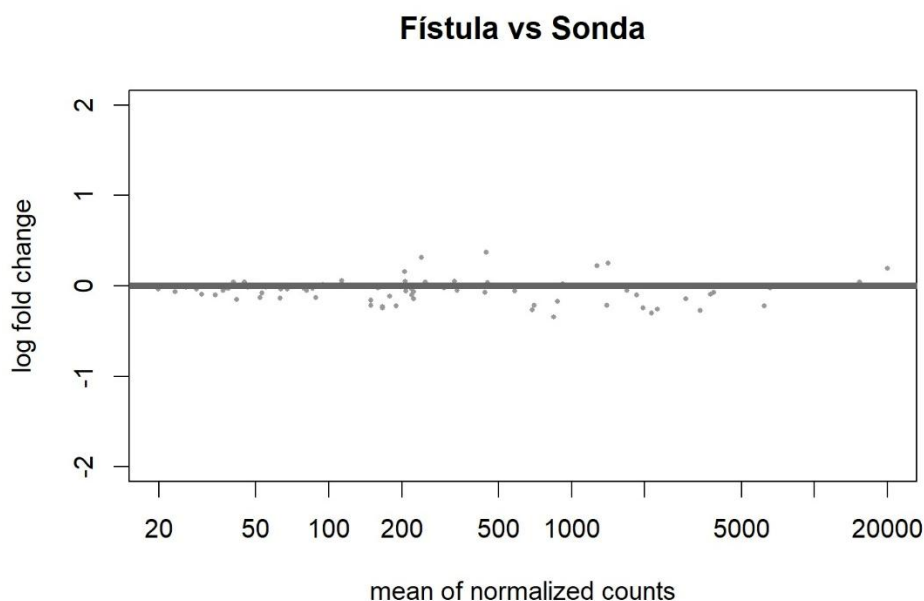


El log2FoldChange (logFC) implica que valores cercanos a cero no presentan diferencias significativas en la abundancia de un género entre métodos, los valores positivos muestran que la abundancia obtenida mediante la fístula es mayor que la obtenida mediante sonda, mientras que cuando el valor es negativo la abundancia obtenida por sonda es mayor a la obtenida por fístula.

Ninguno de los géneros evaluados presentó diferencias estadísticamente significativas, todos los padj fueron mayores a 0,05. En este caso, *Olsnella* y *Prevotellaceae* UCG-003 fueron los géneros con el menor p-valor ajustado (padj = 0,1495), lo que podría sugerir una tendencia a observar leves diferencias entre métodos para esos géneros. Esto último sugiere que aquellos géneros que encabezan la lista podrían, por alguna razón, aparejar dificultades a la hora de lograr un muestreo altamente preciso por sonda.

#### Figura 16

Expresión diferencial de géneros microbianos para método de muestreo según abundancia absoluta media



*Nota.* log fold change: logaritmo en base 2 del cociente entre las abundancias medias fístula/sonda. Mean of normalized counts: promedio general de abundancia absoluta.

#### 4.12 Análisis de redundancia (RDA) a nivel de géneros una vez aplicado el segundo filtro

Con el fin de definir qué grado de variabilidad explican el método de muestreo, factores intrínsecos a cada vaca, o el momento de muestreo, se utiliza un RDA. Esta técnica estadística de múltiples variables permite relacionar simultáneamente y resumir la variación de un conjunto de variables de respuesta (población microbiana) en función de un conjunto de variables

explicativas conocidas (método, vaca, momento), utilizando una regresión lineal. Por último, una matriz con los valores ajustados por la regresión se somete a una PCA, generando una ordenación en el espacio de las variables de respuesta, pero restringida por las variables explicativas (Rojas-Jiménez, 2022).

**Tabla 14**

*RDA a nivel de géneros para momento de muestreo, método de muestreo, vaca*

	GL	SC	F	Pr(>F)	Var. Total	Var. Explicativa
Momento de muestreo	2	2,07	13,88	0,001	4,78	0,43
Método de muestreo	1	0,10	1,41	0,177	4,78	0,02
Vaca	6	0,73	1,63	0,063	4,78	0,15
Residual	25	1,86	NA	NA	4,78	0,39
Modelo	9	2,93	4,38	0,001	4,78	0,61

*Nota.* GL: grados de libertad. SC: suma de cuadrados. F: estadístico. Pr(>F): valor p para determinar significancia de F. Var. Total: suma total de la variación. Var. Explicativa: proporción de la varianza total explicada por cada factor.

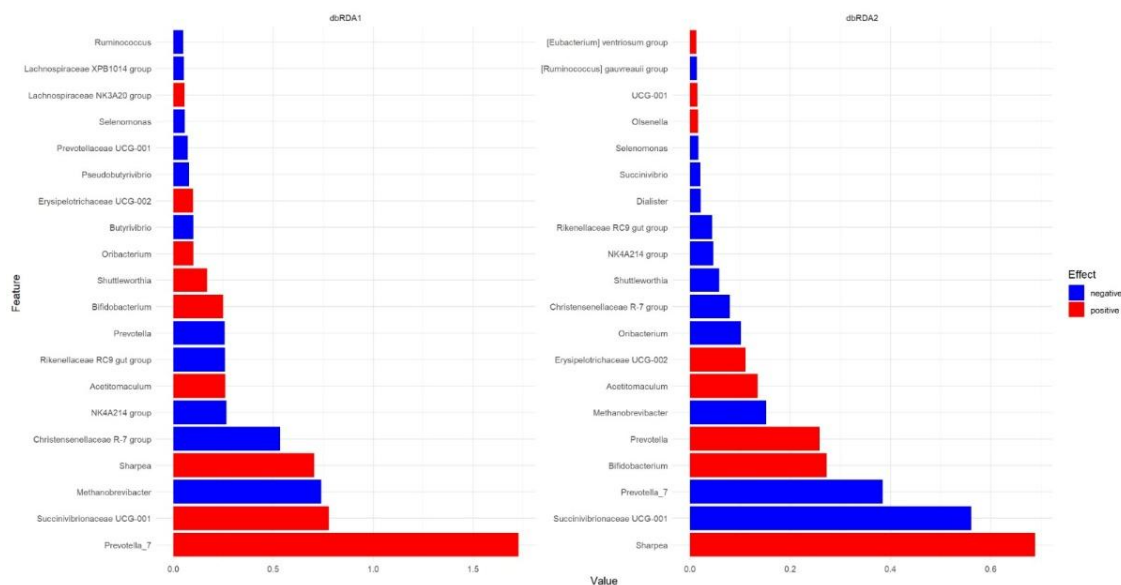
El modelo explica el 61% de la variación, del cual el 43% corresponde al efecto del momento de muestreo, el 15% corresponde al efecto individual (vaca), el 2% corresponde a el método de muestreo.

El momento de muestreo es el principal factor explicativo ( $p=0,001$ ), lo que demuestra nuevamente que el microbioma ruminal es dinámico en el tiempo, seguramente explicado por los cambios en la dieta. En contraste, el método de extracción no presenta diferencia estadística ( $p=0,177$ ), por lo que este factor no aporta significativamente a la variación existente. El efecto intrínseco de cada individuo (vaca) posee cierto grado de influencia sobre la variabilidad existente ( $p=0,063$ ), lo cual tiene sentido biológico debido a la interacción genética del propio individuo (además de otros posibles factores como nivel de consumo o selección de alimento) con los distintos grupos microbianos del rumen, sin embargo, es de recalcar que no pueden hacerse inferencias precisas sobre el efecto individual de cada vaca debido al desbalance de muestras (sólo 35 de 42 muestras lograron secuenciarse y analizarse).

Con el fin de comprender cuales son los géneros que aportan más a la variación, se presenta un gráfico dbRDA (Análisis de Redundancia basado en distancias).

**Figura 17**

“Loadings” de los géneros microbianos sobre los dos ejes principales del dbRDA



**Nota.** Loadings: “pesos de los géneros” dbRDA1: Loadings sobre el eje principal (1). dbRDA2: Loadings sobre el eje secundario (2). Negative: se asocian al extremo negativo. Positive: se asocian al extremo positivo.

Lo Loadings representan cuánto (y en que “dirección”) cada género contribuye a los ejes del dbRDA (análisis de redundancia basado en distancias).

El primer eje (dbRDA1) representa el principal factor de variación, que se asocia al cambio dietario y fisiológico entre el preparto y el posparto. En este eje, las cargas positivas (rojas) corresponden a géneros que aumentan su abundancia en el posparto, como por ejemplo *Prevotella\_7*, *Succinivibrionaceae UCG-001*, *Sharpea* y *Acetivomaculum*, vinculadas a una mayor fermentación de carbohidratos rápidamente degradables. En contraste las cargas negativas (azules) incluyen en general géneros asociados al preparto y por ende a la degradación de fibra y condiciones ruminales más estables, como por ejemplo *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, *Methanobrevibacter*. El tamaño de las barras refleja la contribución de cada género a este eje, evidenciando que las mayores diferencias entre momentos se deben a la transición a comunidades más amilolíticas en el posparto.

El segundo eje (dbRDA2) explica una proporción menor de la variabilidad, seguramente debido al efecto individual de cada vaca.

A modo de complementar la comparación entre métodos y observar su estabilidad, se calcularon las abundancias relativas promedio (media S/F) y los coeficientes de variación (%CV) entre métodos.

**Tabla 15**

*Abundancias (%) promedio sonda/fistula y %CV entre los métodos para cada género mencionado*

Géneros microbianos	Preparto (-30)		Posparto (+35)		Posparto (+65)	
	Media S/F	CV	Media S/F	CV	Media S/F	CV
<i>Acetitomaculum</i>	1,1	5,2	5,1	26,8	4,4	44
<i>Amnipila</i>	0,1	2,3	0	n/c	0	n/c
<i>Anaerovibrio</i>	0,3	17,3	0	n/c	0	n/c
<i>Anaerovorax</i>	0,3	1,7	0	n/c	0	n/c
<i>Atopobium</i>	0,1	25,8	0	n/c	0	n/c
<i>Bifidobacterium</i>	0	n/c	5,1	20,7	2,7	65,4
<i>Butyrivibrio</i>	2,1	7,9	0,5	5,1	0,5	28,2
<i>Candidatus Saccharimonas</i>	0,2	7,5	0	n/c	0	n/c
<i>Christensenellaceae R-7 group</i>	10,2	1,9	1,3	5,8	1,9	31
<i>Colidextribacter</i>	0,1	7,2	0	n/c	0,1	0,2
<i>Coprococcus</i>	0,2	5,7	0,2	3,5	0,2	5
<i>Defluviitaleaceae UCG-011</i>	0,1	3,5	0	n/c	0	n/c
<i>Desulfovibrio</i>	0,2	10,1	0	n/c	0	n/c
<i>[Eubacterium] hallii group</i>	0,4	2,6	0,2	2,6	0,3	29
<i>[Eubacterium] nodatum group</i>	0,2	3,6	0	n/c	0,2	29,3
<i>[Eubacterium] ruminantium group</i>	0,5	13,1	0,5	2,4	0,6	4,4
<i>[Eubacterium] ventriosum group</i>	0,2	0,6	0,3	32,5	0,3	27
<i>[Eubacterium] xylanophilum group</i>	0,2	24,9	0	n/c	0	n/c
<i>Erysipelotrichaceae UCG-002</i>	0	n/c	2,1	3,1	0,7	52,6
<i>Family XIII AD3011 group</i>	0,5	5	0	n/c	0,2	30,3
<i>Family XIII UCG-001</i>	0,2	5,3	0	n/c	0	n/c
<i>FD2005</i>	0,5	4,3	0,2	1,1	0,2	11,3
<i>Fibrobacter</i>	0,5	3	0	n/c	0	n/c
<i>Lachnospiraceae AC2044 group</i>	1	9,4	0,2	9,1	0,2	9,2
<i>Lachnospiraceae ND3007 group</i>	0,2	2	0	n/c	0	n/c
<i>Lachnospiraceae NK3A20 group</i>	2,2	4,2	2,1	14,6	3,5	42,6
<i>Lachnospiraceae NK4A136 group</i>	0,3	6,9	0	n/c	0	n/c
<i>Lachnospiraceae UCG-002</i>	0,1	3,5	0	n/c	0	n/c
<i>Lachnospiraceae UCG-008</i>	0,1	10,3	0	n/c	0	n/c
<i>Lachnospiraceae XPB1014 group</i>	0,9	15,3	0	n/c	0,1	15,1
<i>Marvinbryantia</i>	0,2	5,6	0,2	12,8	0,2	45,8
<i>Methanobrevibacter</i>	12,8	0,5	1,6	9,8	1,9	26,3
<i>Methanosphaera</i>	0,7	1,3	0	n/c	0,1	31,3
<i>Mogibacterium</i>	0,2	22,6	0	n/c	0	n/c
<i>Monoglobus</i>	0,5	12,8	0	n/c	0	n/c
<i>Moryella</i>	0,2	8,7	0,2	3,3	0,2	43,6

Géneros microbianos	Preparto (-30)		Posparto (+35)		Posparto (+65)	
	Media S/F	CV	Media S/F	CV	Media S/F	CV
<i>NK4A214 group</i>	5,6	0,2	0,9	14,6	1,6	25,1
<i>Olsenella</i>	1,2	30,1	0,8	23,5	1	59,7
<i>Oribacterium</i>	0,8	3	1,2	16,1	2,2	1,3
<i>Papillibacter</i>	0,4	0,4	0	n/c	0	n/c
<i>Prevotella</i>	30,4	4,7	23,5	6,1	21	22,4
<i>Prevotella_7</i>	0	n/c	17,2	12	18,6	32,8
<i>Prevotellaceae Ga6A1 group</i>	0	n/c	0,5	39,7	0,2	50,9
<i>Prevotellaceae NK3B31 group</i>	0,4	10,4	0	n/c	0	n/c
<i>Prevotellaceae UCG-001</i>	2,5	1,8	1,6	27,2	1,1	18,7
<i>Prevotellaceae UCG-003</i>	1,2	12,7	0,4	30,4	0,3	19,8
<i>Prevotellaceae UCG-004</i>	0,1	8,1	0	n/c	0,1	15,9
<i>Prevotellaceae YAB2003 group</i>	0,1	1,8	0,5	10,4	0,3	15,8
<i>probable genus 10</i>	0,2	22,2	0	n/c	0	n/c
<i>Pseudobutyrvibrio</i>	1,7	4,3	0,4	6,3	0,4	11,8
<i>Pseudoscardovia</i>	0	n/c	0,5	40,7	0,8	49
<i>Rikenellaceae RC9 gut group</i>	4,7	9,2	0,7	28,6	0,7	2
<i>Roseburia</i>	0,2	21,8	0	n/c	0	n/c
<i>Ruminobacter</i>	0	n/c	0	n/c	0,3	54,5
<i>Ruminococcus</i>	2,7	14	1,2	20,6	3,1	19
<i>[Ruminococcus] gauvreauii group</i>	0,4	0,8	0,7	6,3	1	38,6
<i>Saccharofermentans</i>	0,9	2,8	0,2	26,4	0,3	16
<i>Schwartzia</i>	0,1	4,3	0	n/c	0	n/c
<i>Selenomonas</i>	1,4	0,3	0,2	2,1	0,3	2,2
<i>Sharpea</i>	0	n/c	15	12,9	4,1	42,8
<i>Shuttleworthia</i>	0,4	5,4	2,4	10,7	2,2	38,5
<i>Succiniclasticum</i>	1,1	14,3	1	9,1	1,5	5,4
<i>Succinivibrio</i>	0	n/c	0,4	27,4	0	n/c
<i>Succinivibrionaceae UCG-001</i>	0	n/c	4,3	7,3	14,5	8,1
<i>Succinivibrionaceae UCG-002</i>	0	n/c	0	n/c	0,6	32,4
<i>Syntrophococcus</i>	0	n/c	0,2	2,8	0,2	42,7
<i>Treponema</i>	0,4	47,5	0,3	16,9	0,2	34,4
<i>UCG-001</i>	0,2	13	0,4	48,2	0,4	2,2
<i>UCG-002</i>	0,2	0,5	0	n/c	0	n/c
<i>UCG-004</i>	0,2	8,6	0	n/c	0	n/c
<i>UCG-005</i>	0,9	0,1	0	n/c	0,2	18
<i>Veillonellaceae UCG-001</i>	0,3	23,9	0	n/c	0	n/c

*Nota.* Valores expresados en porcentaje (%). S: sonda. F: fístula. CV: coeficiente de variación.

A primera vista se observa que muchos géneros con abundancias bajas poseen altos %CV. Son ejemplos fácilmente observables: *Treponema* (día -30; abundancia promedio 0,4%; %CV de 47,5), *Pseudoscardovia* (día +35; abundancia promedio 0,5%; %CV de 40,7), *Ruminobacter* (día +65; abundancia promedio 0,3%; %CV de 54,4).

Sin embargo, existen diversas respuestas en los %CV según el momento de muestreo: en el preparto la distribución de los géneros es un poco más equitativa, además de que los %CV son en general más bajos que en el posparto, lo que podría sugerir un microbioma más estable en el espacio ruminal y una mayor estabilidad del método alternativo. Algunos de los géneros

menos sensibles al método en el preparto son *Prevotella*, *Methanobrevibacter*, *NK4A214 group*, *Christensenellaceae R-7 group*. De igual forma, puede observarse que un género tan abundante en los tres momentos de muestreo como lo es *Prevotella* aumenta drásticamente su sensibilidad al método en el posparto.

#### 4.13 Análisis y observaciones principales sobre la estabilidad del método alternativo

##### mediante la utilización del %CV una vez aplicado el segundo filtro

A continuación, se presenta el resumen con los promedios de medias de abundancia (S/F), desvío estándar de la población analizada (DE), y %CV, según momento de muestreo.

**Tabla 16**

*Dispersión de abundancias relativas de géneros según método de muestreo para los tres momentos*

Preparto (-30)			Posparto (+35)			Posparto (+65)		
Media S/F	DE	CV	Media S/F	DE	CV	Media S/F	DE	CV
1,3	0,1	8,7	1,3	0,2	15,4	1,3	0,3	26,6

*Nota.* Valores expresados en porcentaje (%). S: sonda. F: fistula. DE: desviación estándar. CV: coeficiente de variación.

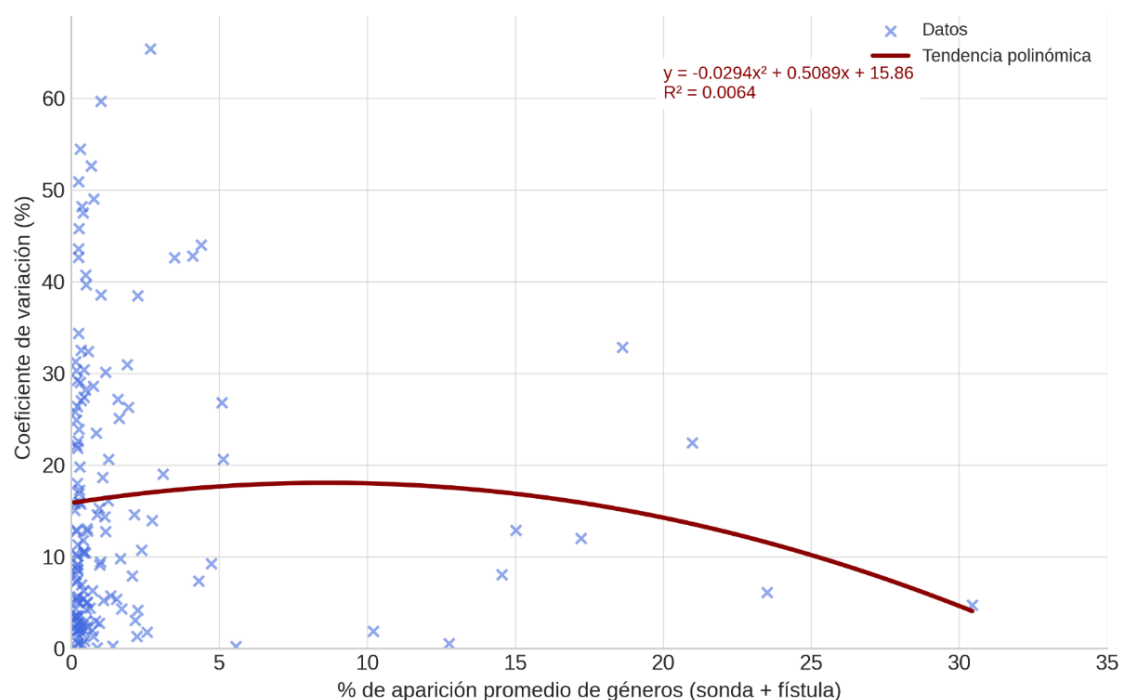
Es notorio el efecto del momento de muestreo sobre %CV promedio. A medida que aumenta el momento de muestreo también lo hace el %CV, pasando de 8,7% en el momento -30 a 15,4% en el momento +35, y 26,6% en el momento +65, es decir que aumenta aproximadamente 3 veces (206%) entre los momentos extremos.

Este comportamiento sugiere nuevamente que el parto (y por consiguiente el cambio hacia una dieta de mejor calidad y mayor inclusión de concentrados, y los cambios fisiológicos), determina un aumento en la complejidad para lograr un muestreo representativo del perfil microbiano de líquido ruminal mediante el método de la sonda oro-ruminal. Como ya se ha discutido, a nivel de las correlaciones de Pearson y Spearman, tanto el volumen como la distribución del alimento dentro del rumen y por lo tanto la forma en la que la sonda puede ingresar en la cavidad ruminal, así como el cambio en el perfil microbiano, podrían explicar el aumento de la sensibilidad del método.

Por otro lado, resultaría visualizar la relación entre la abundancia relativa de géneros y el %CV entre métodos, ya que este estadístico puede aumentar drásticamente ante pequeñas variaciones absolutas en géneros de baja abundancia. A continuación, se presenta un gráfico donde se incorporan los datos de todos los momentos de muestreo, relacionando (para cada género microbiano en cada momento) la abundancia de los géneros y sus respectivos %CV entre los métodos

**Figura 18**

*Asociación entre %CV de métodos y abundancia relativa de géneros para los momentos de muestreo*



*Nota.* Valores expresados en %

Al analizar la relación entre el %CV y la abundancia relativa promedio entre métodos de los distintos géneros bacterianos, se observa una leve tendencia donde a menor proporción de un género bacteriano mayor es su %CV. Sin embargo, esta tendencia posee una alta variabilidad, ya que también se identifican casos en los que géneros con baja abundancia no presentan un alto %CV. Esto sugiere que no existe una fuerte asociación negativa entre la abundancia relativa y el %CV. Esto último también puede evidenciarse al observar el ajuste de la curva polinómica, la cual posee un  $R^2$  muy bajo (0,0064). Esta característica en el comportamiento de los datos demuestra que las bajas abundancias de géneros son más sensibles a pequeñas fluctuaciones absolutas entre los métodos, obteniendo mayores %CV en géneros de baja abundancia.

Una tendencia que sí parece ser clara es que a menor abundancia de los géneros más variable es la respuesta en %CV, por lo que podría convenir definir un punto crítico de abundancia de géneros donde la estabilidad del método tienda a ser mayor.

#### 4.14 Zona de estabilidad y determinación del punto crítico de abundancia una vez aplicado el segundo filtro

La intención es explorar gráfica y cuantitativamente un punto en la abundancia de los géneros a partir del cual los %CV muestren un comportamiento más predecible y estable. A priori, observando la Figura 18, parecería que este punto se encuentra en torno al valor de 5% de abundancia promedio (sonda/fístula) de géneros, y para demostrarlo se presenta a continuación información estadística sobre dichas abundancias relacionadas al %CV.

**Tabla 17**

*Resumen estadístico del %CV según rangos de abundancia relativa de géneros microbianos*

Abundancia	Máximo CV	Mínimo CV	Promedio CV	Mediana CV	Desvío estándar CV
Global	65,4	0,1	16,1	10,7	14,9
Baja (<5%)	65,4	0,1	16,5	10,7	15,2
Alta (≥5%)	32,8	0,2	12,4	10	10,9

*Nota.* Valores expresados en porcentaje (%). Global: hace referencia a que fueron utilizados todos los datos de la población evaluada. CV: coeficiente de variación.

Al dividir la población en dos subconjuntos (baja abundancia y alta abundancia) y aplicarles los estadísticos, se observa que: las bajas abundancias relativas presentan un mayor %CV promedio, una mayor dispersión (desvío estándar del %CV más elevado) y mayor amplitud entre sus valores extremos; en cambio las mayores abundancias poseen %CV promedio más bajo y consistente explicado por un menor desvío estándar.

Esto sugiere que aproximadamente por debajo del %5 de abundancia de géneros el método de extracción de líquido ruminal podría tornarse más errático.

#### 4.15 Observación de las señales biológicas del método alternativo una vez aplicado el segundo filtro

Más allá de la sensibilidad general del método alternativo, de los resultados observados en el análisis de expresión diferencial, y de las correlaciones Pearson y Spearman, vale la pena



visualizar el grado de similitud de géneros del perfil central de microorganismo logrado en cada método de extracción de líquido ruminal. Para esto, se resume a continuación el microbioma central según el método para cada momento de muestreo.

**Tabla 18**

*Perfil microbiano central logrado por cada método de extracción en el preparto (-30 días)*

Preparto (-30)			
Fístula		Sonda	
Género	%	Género	%
Prevotella	31,9	Prevotella	29,0
Methanobrevibacter	12,8	Methanobrevibacter	12,7
Christensenellaceae R-7 group	10,4	Christensenellaceae R-7 group	10,0
NK4A214 group	5,6	NK4A214 group	5,5
Rikenellaceae RC9 gut group	5,2	Rikenellaceae RC9 gut group	4,3
Prevotellaceae UCG-001	2,6	Ruminococcus	3,1
Ruminococcus	2,3	Prevotellaceae UCG-001	2,5
Lachnospiraceae NK3A20 group	2,1	Lachnospiraceae NK3A20 group	2,3
Butyrivibrio	1,9	Butyrivibrio	2,2
Pseudobutyrvibrio	1,6	Pseudobutyrvibrio	1,8
Selenomonas	1,4	Olsenella	1,5
Prevotellaceae UCG-003	1,3	Selenomonas	1,4
Acetitomaculum	1,0	Succiniclasicum	1,3
		Acetitomaculum	1,1
		Lachnospiraceae AC2044 group	1,1

**Tabla 19**

*Perfil microbiano central logrado por cada método de extracción en el posparto (+35 días)*

Posparto (+35)			
Fístula		Sonda	
Género	%	Género	%
Prevotella	24,9	Prevotella	22,1
Prevotella_7	19,3	Sharpea	17,0
Sharpea	13,1	Prevotella_7	15,1
Bifidobacterium	4,1	Acetitomaculum	6,4
Succinivibrionaceae UCG-001	4,0	Bifidobacterium	6,2
Acetitomaculum	3,7	Succinivibrionaceae UCG-001	4,6
Erysipelotrichaceae UCG-002	2,2	Shuttleworthia	2,6
Shuttleworthia	2,1	Lachnospiraceae NK3A20 group	2,4
Prevotellaceae UCG-001	2,0	Erysipelotrichaceae UCG-002	2,1
Lachnospiraceae NK3A20 group	1,8	Methanobrevibacter	1,8
Ruminococcus	1,5		
Methanobrevibacter	1,5		

**Tabla 20**

*Perfil microbiano central logrado por cada método de extracción en el posparto (+65 días)*

Posparto (+65)			
Fístula		Sonda	
Género	%	Género	%
Prevotella	25,7	Prevotella	16,3
Prevotella_7	24,7	Succinivibrionaceae UCG-001	13,4
Succinivibrionaceae UCG-001	15,7	Prevotella_7	12,5
Ruminococcus	2,5	Acetitomaculum	6,3
Acetitomaculum	2,5	Sharpea	5,9
Sharpea	2,3	Lachnospiraceae NK3A20 group	5,0
Oribacterium	2,2	Bifidobacterium	4,4
Lachnospiraceae NK3A20 group	2,0	Ruminococcus	3,7
Succinilasticum	1,4	Shuttleworthia	3,1
Methanobrevibacter	1,4	Christensenellaceae R-7 group	2,5
		Methanobrevibacter	2,4
		Oribacterium	2,2

La sonda logra detectar una alta proporción de los microorganismos que detecta el método de extracción por fístula. La sonda comparte: en el momento -30 el 92,3% de los géneros; en el momento +35 el 83,3% de los géneros; en el momento +65 el 90% de los géneros.

En promedio la sonda comparte el 88,5% de los géneros centrales que detecta el método de extracción por fístula.

Esto es coincidente con lo expresado por Paz et al. (2016), los cuales compararon ambos métodos de muestreo en vacas lactantes de 4 años promedio. Agruparon las lecturas de ARNr en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) y utilizaron un filtro en el extremo de la sonda. Encontraron que tampoco existían diferencias en la riqueza ni diversidad de la comunidad microbiana según el método de extracción, y sugirieron que la comunidad microbiana lograda por el método de sonda oro-ruminal con el agregado de las partículas adheridas al filtro es representativa de la comunidad bacteriana del rumen, siendo esto coincidente en parte con el presente trabajo, ya que la sonda no poseía un filtro en el extremo y por lo tanto también se recolectaban azarosamente muestras sólidas.

## 5. Conclusión

Los resultados obtenidos demuestran que el método alternativo de muestreo sonda oro-ruminal ofreció una buena señal biológica y permitió caracterizar de forma precisa la comunidad microbiana procariota del líquido ruminal. Esto indica que, bajo las condiciones controladas de muestreo, la sonda puede utilizarse como un método alternativo confiable. No obstante, a pesar de que la sonda oro-ruminal mantuvo una buena concordancia general, el avance en el periodo experimental (desde -30 a +65) que se caracteriza por cambios fisiológicos y nutricionales, influyó negativamente sobre la exactitud del método alternativo.

En cuanto a la dinámica del perfil bacteriano central, se observó una transición entre el parto (-30) y el posparto (+35, +65). En el parto predominaron bacterias fibrolíticas y la arquea *Methanobrevibacter* asociada a una dieta alta en forraje, y en el posparto la comunidad se desplazó hacia géneros amilolíticos y sacarolíticos.

## 6. Bibliografía

- Acosta, Y. M. (2002). Inicio de lactancia: ¿Oportunidad o amenaza? En Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (Ed.), *Intensificación en lechería: ¿Una alternativa rentable?* (pp. 1–8).  
<https://ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/15903/1/INIA.CREA.FA.CIPIL.pdf>
- Andersen, J. B., Sehested, J., & Ingvarsten, K. L. (1999). Effect of dry cow feeding strategy on rumen pH, concentration of volatile fatty acids and rumen epithelium development. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science*, 49(3), 149-155.  
<https://doi.org/10.1080/090647099424051>
- Aragón Sierra, R. E. (1998). *Conservación de forrajes para alimentación de bovinos: Ensilaje y henificación*. Corpoica; Produmedios.  
<https://repository.agrosavia.co/server/api/core/bitstreams/141cbb83-eb58-43c4-be9f-c301298380b2/content>
- Armstrong, D. G., & Smithard, R. R. (1979). The fate of carbohydrates in the small and large intestines of the ruminant. *Proceedings of the Nutrition Society*, 38, 283-294.  
<https://coea.short.gy/C13D47>
- Bach, A., Calsamiglia, S., & Stern, M. (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 88(suppl.), E9-E21. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73133-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73133-7)
- Bauman, D., & Currie, W. (1980). Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, 63, 1514-1529. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)83111-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)83111-0)
- Bell, A. W. (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*, 73(9), 2804-2819.  
<https://doi.org/10.2527/1995.7392804x>
- Berretta, E. J. (2003). *Perfiles por país del recurso pastura/forraje: Uruguay*. FAO.  
<https://studylib.es/doc/4449366/perfiles-por-país-del-recurso-pastura-forraje-uruguay>
- Betancur-Murillo, C. L., Aguilar-Marín, S. B., & Jovel, J. (2023). Prevotella: A key player in ruminal metabolism. *Microorganisms*, 11(1), Artículo e1.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11010001>
- Blanco, M. (1999). *Bacterias ruminales*. Sitio Argentino de Producción Animal.  
<https://coea.short.gy/JXUWcv>
- Bryant, M. P. (1956). The characteristics of strains of Selenomonas isolated from bovine rumen contents. *Journal of Bacteriology*, 72(2), 162-167. <https://doi.org/10.1128/jb.72.2.162-167.1956>
- Bukowska-Faniband, E., Andersson, T., & Lood, R. (2023, 30 de abril). *16S rRNA sequencing: A PCR-based technique for identifying bacterial species*. [Video]. JoVE Science Education.  
<https://www.jove.com/es/v/10510/16s-rrna-sequencing-identifying-bacterial-species-by-pcr?language=Spanish>
- Buxton, D. R., & Redfearn, D. D. (1997). Plant limitations to fiber digestion and utilization. *The Journal of Nutrition*, 127(5), 814S-818S. <https://doi.org/10.1093/jn/127.5.814S>

- Callahan, B. (2024, 15 de noviembre). *Silva taxonomic training data formatted for DADA2 (Silva version 138.2)*. [Dataset]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.14169026>
- Calsamiglia, S., Castillejos, L., & Busquet, M. (2005). *Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno lechero*. Sitio Argentino de Producción Animal. <https://coea.short.gy/ZLKK15>
- Carámbula, R. M. (2002). *Pasturas y forrajes: Vol. 1. Potenciales y alternativas para producir forraje*. Hemisferio Sur.
- Casella, A. C., & Ciuffolini, A. (2005). *Guía práctica de lectura de comederos*. Sitio Argentino de Producción Animal. <https://coea.short.gy/eGkdXW>
- Cattani, P. (2011). *Henificación, conservación de forrajes*. Sitio Argentino de Producción Animal. [https://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_reservas/reservas\\_henos/30-Henificacion.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_henos/30-Henificacion.pdf)
- Chávez-Soto, D., Vázquez-Armijo, J., Hernández-Meléndez, J., Martínez-González, J., Esparza-Jiménez, S., & López-Aguirre, D. (2021). Los aceites esenciales en los pequeños rumiantes y su efecto sobre la productividad. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24, Artículo e70. <https://www.revista.coba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/download/3468/1612>
- Chen, J., Zhang, X., Chang, X., Wei, B., Fang, Y., Song, S., Gong, D., Huang, D., Sun, Y., Dong, X., Zhao, Y., & Zhao, Z. (2024). Multi-omics analysis reveals the effects of host-rumen microbiota interactions on growth performance in a goat model. *Frontiers in Microbiology*, 15, Artículo e1445223. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11417024/>
- Christopherson, M., Dawson, J., Stevenson, D., Cunningham, A., Bramhacharya, S., Weimer, P., Kendzierski, C., & Suen, G. (2014). Unique aspects of fiber degradation by the ruminal ethanologen *Ruminococcus albus* 7 revealed by physiological and transcriptomic analysis. *BMC Genomics*, 15, Artículo e1066. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1066>
- Coduri Pacheco, M., Fernández Muzio, J., & Severi Seizer, M. (2024). *Evaluación del grano de arroz con cascara (GACC) como suplemento ofrecido en autoconsumo a vacunos pastoreando raigrás: efecto sobre el consumo, fermentación ruminal, cinética de la degradación in situ y digestibilidad* [Trabajo final de grado, Universidad de la República]. Colibri. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/51406>
- Colombatto, D. (s.f.). *Potencial de la monensina para reducir las emisiones de metano por parte de la ganadería*. Sitio Argentino de Producción Animal. <https://coea.short.gy/HMEcVx>
- Cooperativa Nacional de Productores de Leche. (2009). *Composición de los principales alimentos*. <http://www.eleche.com.uy/files/cartilla-4-tabla-de-composicion-de-alimentos?es>
- Cortés-López, N., Ordóñez-Baquera, P., & Domínguez-Viveros, J. (2020). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico: Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(4), 1150-1173. <https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/5202/4468>

- De Assis Lage, C., Räisänen, S., Melgar, A., Nedelkov, K., Chen, X., Oh, J., Fetter, M., Indugu, N., Bender, J., Vecchiarelli, B., Hennessy, M., Pitta, D., & Nikolov Hristov, A. (2020). Comparison of two sampling techniques for evaluating ruminal fermentation and microbiota in the planktonic phase of rumen digesta in dairy cows. *Frontiers in Microbiology*, 11, Artículo e618032. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33424820/>
- Dennis, S., Nagareja, T., & Bartley, E. (1981). Effects of lasalocid or monensin on lactate-producing or-using rumen bacteria. *Journal of Animal Science*, 52(2), 418-426. <https://doi.org/10.2527/jas1981.522418x>
- Diao, Q., Zhang, R., & Fu, T. (2019). Review of strategies to promote rumen development in calves. *Animals*, 9(8), Artículo e490. <https://doi.org/10.3390/ani9080490>
- Dias, F. M., & Allaire, F. R. (1982). Dry period to maximize milk production over two consecutive lactations. *Journal of Dairy Science*, 65(7), 136-145. [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(82\)82162-0/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(82)82162-0/pdf)
- Dirección de Estadísticas Agropecuarias. (2017). *Estadísticas del Sector Lácteo 2016*. MGAP. [https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/noticias/comunicado\\_leche\\_2017\\_0\\_0.pdf](https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/noticias/comunicado_leche_2017_0_0.pdf)
- Dueholm, M. K. D., Andersen, K. S., Korntved, A.-K. C., Rudkjøbing, V., Alves, M., Bajón-Fernández, Y., Batstone, D., Butler, C., Cruz, M., Davidsson, Å., Erijman, L., Holliger, C., Koch, K., Kreuzinger, N., Lee, C., Lyberatos, G., Mutnuri, S., O'Flaherty, V., Oleskowicz-Popiel, P., ... Nielsen, P. H. (2024). MiDAS 5: Global diversity of bacteria and archaea in anaerobic digesters. *Nature Communications*, 15(1), Artículo e5361. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49641-y>
- Enemark, J. M. D. (2009). The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. *The Veterinary Journal*, 176(1), 32-43. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.021>
- Fariña, S. R., & Chilibraste, P. (2019). Opportunities and challenges for the growth of milk production from pasture: The case of farm systems in Uruguay. *Agricultural Systems*, 176, Artículo e102631. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2019.05.001>
- Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz Nieto, J., & Valdezate Ramos, S. (2010). *Procedimientos en microbiología clínica: Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. SEIMC. <https://seimc.org/wp-content/uploads/2025/06/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
- Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. (2021). *Tablas FEDNA 2019*. <http://fundacionfedna.org/sites/default/files/Tablas%20FEDNA%202019.xls>
- Geishauser, T. (1993). An instrument for collection and transfer of ruminal fluid and for administration of water soluble drugs in adult cattle. *The Bovine Practitioner*, (27), 38-42. <https://pdfs.semanticscholar.org/7291/175bbfe862a3e16685d21f40cd243c600bcb.pdf>

- González-Chappe, L., Bruni, M., Dall-Orsoletta, A., Chilibroste, P., Meikle, A., Adrien, M., Casal, A., Damián, J., Naya, H., Arturo-Schaan, M., & Mattiauda, D. (2025). Phytochemicals and monensin in dairy cows: Impact on productive performance and ruminal fermentation profile. *Animals*, 15(15), Artículo e2172.  
<https://doi.org/10.3390/ani15152172>
- Greening, R. C., & Leedle, J. A. (1989). Enrichment and isolation of *Acetitomaculum ruminis*, gen. nov., sp. nov.: Acetogenic bacteria from the bovine rumen. *Archives of Microbiology*, 151(4), 399-406. <https://doi.org/10.1007/BF00416597>
- Grummer, R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*, 73(9), 2820-2833.  
<https://doi.org/10.2527/1995.7392820x>
- Heinrichs, J. (2002). *Evaluating particle size of forages and TMRs using the New Penn State Forage Particle Separator*. Pennsylvania State University. <https://jaylor.com/wp-content/uploads/2021/11/76.pdf>
- Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., & Janssen, P. (2015). Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports*, 5, Artículo e14567.  
<https://www.nature.com/articles/srep14567>
- Hobson, P. N., & Stewart, C. S. (Eds.). (1997). *The rumen microbial ecosystem* (2<sup>nd</sup> ed.). Springer.
- Hook, S. E., Wright, A.-D., & McBride, B. (2010). Methanogens: Methan producers of the rumen and mitigation strategies. *Archea*, 2010(1), Artículo e945785.  
<https://doi.org/10.1155/2010/945785>
- Hristov, A. N., Oh, J., Firkins, J. L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H. P. S., Adesogan, A. T., Yang, W., Lee, C., Gerber, P. J., Henderson, B., & Tricarico, J. M. (2013). Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science*, 91(11), 5045-5069.  
<https://doi.org/10.2527/jas.2013-6583>
- Kammes, K. L., & Allen, M. S. (2012). Rates of particle size reduction and passage are faster for legume compared with cool-season grass, resulting in lower rumen fill and less effective fiber. *Journal of Dairy Science*, 95(6), 3288-3297.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2011-5022>
- Kamra, D. N. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 89(1), 124-135.  
<http://www.jstor.org/stable/24110438>
- Khafipour, E., Li, S., Tun, H. M., Derakhshani, H., Moossavi, S., & Plaizier, J. C. (2016). Effects of grain feeding on microbiota in the digestive tract of cattle. *Animal Frontiers*, 6(2), 13-19. <https://doi.org/10.2527/af.2016-0018>
- Koike, S., & Kobayashi, Y. (2009). Fibrolytic Rumen BACTERIA: Their ecology and functions. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(1), 131-138.  
<https://doi.org/10.5713/ajas.2009.r.01>

- Kong, F., Wang, S., Zhang, Y., Li, C., Dai, D., Guo, C., Wang, Y., Cao, Z., Yang, H., Bi, Y., Wang, W., & Li, S. (2025). Rumen microbiome associates with postpartum ketosis development in dairy cows: A prospective nested case–control study. *Microbiome*, 13(1), Artículo e69. <https://doi.org/10.1186/s40168-025-02072-3>
- Kozloski, G. (2017). *Bioquímica dos ruminantes* (3a ed. rev. ampl.). UFSM. [https://www.google.com.uy/books/edition/Bioqu%C3%ADmica\\_dos\\_Ruminantes/tPYnDwAAQBAJ?hl=es&gbpv=1&dq=inauthor:%22Gilberto+Vilmar+Kozloski%22&printsec=frontcover](https://www.google.com.uy/books/edition/Bioqu%C3%ADmica_dos_Ruminantes/tPYnDwAAQBAJ?hl=es&gbpv=1&dq=inauthor:%22Gilberto+Vilmar+Kozloski%22&printsec=frontcover)
- Krause, D. O., Denman, S. E., Mackie, R. I., Morrison, M., Rae, A. L., Attwood, G. T., & McSweeney, C. S. (2003). Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: Microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol Reviews*, 27(5), 663-693. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00072-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00072-X)
- Kumar, S., Treloar, B. P., Teh, K. H., McKenzie, C. M., Henderson, G., Attwood, G. T., Waters, S. M., Patchett, M. L., & Janssen, P. H. (2018). *Sharpea* and *Kandleria* are lactic acid producing rumen bacteria that do not change their fermentation products when co-cultured with a methanogen. *Anaerobe*, 54, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.07.008>
- Larsen, M., Hansen, N. P., Weisbjerg, M. R., & Lund, P. (2020). Evaluation of the ororumenal FLORA sampling device for rumen fluid sampling in intact cattle. *Journal of Dairy Science*, 103(1), 447-450. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16972>
- Lederberg, J., & McCray, A. T. (2001). ‘Ome sweet ‘omics: A genealogical treasury of words. *The Scientist*, 15(7), Artículo e8. <https://lhncbc.nlm.nih.gov/LHC-publications/PDF/pub2001047.pdf>
- Li, Z., Mu, C., Xu, Y., Shen, J., & Zhu, W. (2020). Changes in the solid-, liquid-, and epithelium-associated bacterial communities in the rumen of hu lambs in response to dietary urea supplementation. *Frontiers in Microbiology*, 11, Artículo e244. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00244>
- Liu, K., Zhang, Y., Huang, G., Zheng, N., Zhao, S., & Wang, J. (2022). Rumen bacterial community is associated with the variations of total milk solid content in Holstein lactating cows. *Animal Nutrition*, 9, 175-183. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.12.005>
- Martínez-Fernández, G., Denman, S. E., & McSweeney, C. S. (2019). Sample processing methods impacts on rumen microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 10, Artículo e861. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00861>
- McCowan, R., Cheng, K., Bailey, C. B. M., & Costerton, J. (1978). Adhesion of bacteria to the epithelial cell surfaces within the reticulo-rumen of cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(1), 149-155. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC242795/pdf/aem00216-0167.pdf>



- McGuire, M. A., Theurer, M., Vicini, J. L., & Crooker, B. (2004). Controlling energy balance in early lactation. En University of Alberta (Ed.), *Advances in Dairy Technology: Vol. 16: Proceedings of the Western Canadian Dairy Seminar* (pp. 241-252).  
[https://www.researchgate.net/publication/253868520\\_Controlling\\_Energy\\_Balance\\_in\\_Early\\_Lactation](https://www.researchgate.net/publication/253868520_Controlling_Energy_Balance_in_Early_Lactation)
- Meikle, A., Cavestany, D., Carriquiry, M., Adrien, M. d., Artegoitia, V., Pereira, I., Ruprecht, G., Pessina, P., Rama, G., Fernández, A., Breijo, M., Laborde, D., Pritsch, O., Ramos, J., de Torres, E., Nicolini, P., Mendoza, A., Dutour, J., Fajardo, M., . . . Chilibroste, P. (2013). Advances in knowledge of the dairy cow during the transition period in Uruguay: A multidisciplinary approach. *Agrociencia (Uruguay)*, 17(1), 141-152.  
<https://doi.org/10.31285/AGRO.17.528>
- Mieres, J. (Ed.). (2004). *Guía para la alimentación de rumiantes*. INIA.  
<https://ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2887/1/111219240807141556.pdf>
- Moraïs, S., & Mizrahi, I. (2019). Islands in the stream: From individual to communal fiber degradation in the rumen ecosystem. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(4), 362-379.  
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuz007>
- Mu, Y., Qi, W., Zhang, T., Zhang, J., & Mao, S. (2022). Multi-omics analysis revealed coordinated responses of rumen microbiome and epithelium to high-grain-induced subacute rumen acidosis in lactating dairy cows. *mSystems*, 7(1), Artículo e01490-21.  
<https://doi.org/10.1128/msystems.01490-21>
- Nan, F. (2002). Descripción de una técnica quirúrgica para la implantación de cánulas ruminales en bovinos. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.), *XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría* (pp. 302-303).  
[https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/526/JB2002\\_302-303.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/526/JB2002_302-303.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. (2021). *Nutrient requirements of dairy cattle* (8<sup>th</sup> rev. ed.). The National Academies Press.
- National Research Council. (1996). *Nutrient requirements of beef cattle* (7<sup>th</sup> ed.). National Academy Press.
- National Research Council (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle* (7<sup>th</sup> rev. ed.). National Academy Press.
- Oficina de Estadísticas Agropecuarias. (2009). *Anuario estadístico agropecuario 2009*. MGAP.  
[https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Documentos%20compartidos/Anuario2009/anuario2009\\_0.zip](https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Documentos%20compartidos/Anuario2009/anuario2009_0.zip)
- Oficina de Estadísticas Agropecuarias. (2011). *Estadísticas del sector Lácteo 2010*. MGAP.  
[https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2020-02/estadisticas\\_del\\_sector\\_lacteo\\_-\\_ano\\_2010\\_-\\_noviembre\\_2011\\_no\\_304.pdf](https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2020-02/estadisticas_del_sector_lacteo_-_ano_2010_-_noviembre_2011_no_304.pdf)
- Oficina de Estadísticas Agropecuarias. (2021). *Estadísticas del Sector Lácteo 2020*. MGAP.  
<https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2021-11/Estad%C3%ADsticas%20L%C3%A1cteos%202021vf.pdf>

- Oficina de Estadísticas Agropecuarias. (2022). *Anuario estadístico agropecuario 2022*. MGAP. [https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2022/O\\_MGAP\\_Anuario\\_estad%C3%ADstico\\_%202022-DIGITAL.pdf](https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2022/O_MGAP_Anuario_estad%C3%ADstico_%202022-DIGITAL.pdf)
- Oficina de Estadísticas Agropecuarias. (2025). *Anuario estadístico agropecuario 2025*. MGAP. <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2025/ANUARIO2025.pdf>
- Paz, H. A., Anderson, C., Muller, M., Kononoff, P., & Fernando, S. (2016). Rumen bacterial community composition in Holstein and Jersey cows is different under same dietary condition and is not affected by sampling method. *Frontiers in Microbiology*, 7, Artículo e1206. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01206>
- Penner, G. B., Aschenbach, J. R., Gäbel, G., Rackwitz, R., & Oba, M. (2009). Epithelial capacity for apical uptake of short chain fatty acids is a key determinant for intraruminal pH and the susceptibility to subacute ruminal acidosis in sheep. *The Journal of nutrition*, 139(9), 1714-1720. <https://doi.org/10.3945/jn.109.108506>
- Perez, H. G., Stevenson, C. K., Lourenco, J. M., & Callaway, T. R. (2024). Understanding rumen microbiology: An overview. *Encyclopedia*, 4(1), 148-157. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia4010013>
- Pidcock, S., Skvortsov, T., Santos, F., Courtney, E., Sui-Ting, K., Creevey, C., & Huws, S. (2021). Phylogenetic systematics of *Butyrivibrio* and *Pseudobutyrvibrio* genomes illustrate vast taxonomic diversity, open genomes and an abundance of carbohydrate- active enzyme family isoforms. *Microbial Genomics*, 7(10), Artículo e638. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000638>
- Pinos Rodríguez, J., & González Muñoz, S. (2000). Efectos biológicos y productivos de los ionóforos en rumiantes. *Interciencia*, 25(8), 379-385. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33905004.pdf>
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583-590. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442006000800008&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000800008&lng=es&tlng=es)
- Principal component analysis (PCA) and principal coordinate analysis (PCoA) for microbial sequencing: Introduction and procedures*. (2025). CD Genomics. <https://www.cd-genomics.com/microbioseq/principal-component-analysis-pca-and-principal-coordinate-analysis-pcoa-for-microbial-sequencing-introduction-and-procedures.html>
- Qiu, X., Qin, X., Chen, L., Chen, Z., Hao, R., Zhang, S., Yang, S., Wang, L., Cui, Y., Li, Y., Ma, Y., Cao, B., & Su, H. (2022). Serum biochemical parameters, rumen fermentation, and rumen bacterial communities are partly driven by the breed and sex of cattle when fed high-grain diet. *Microorganisms*, 10(2), Artículo e323. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020323>

- Ramos-Morales, E., Martín-García, A., Jiménez, E., Arco-Pérez, A., Yáñez-Ruiz, D., Frutos, P., & Hervás, G. (2013). Comparación del muestreo a través de cánula ruminal o sonda esofágica en ovejas y cabras: Parámetros de fermentación y microorganismos del rumen. En Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (Ed.), *42 Jornadas de Estudio AIDA (XV Jornadas sobre Producción Animal)* (Vol. 2, pp. 845-847). <https://digital.csic.es/handle/10261/78639>
- Roche, J. R., Friggens, N. C., Kay, J. K., Fisher, M. W., Stafford, K. J., & Berry, D. P. (2009). Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 5769-5801. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2431>
- Rodríguez, P. A., & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 16(2), 166-167. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>
- Rojas-Jiménez, K. (2022). *Ciencia de datos para ciencias naturales*. [https://bookdown.org/keilor\\_rojas/CienciaDatos/](https://bookdown.org/keilor_rojas/CienciaDatos/)
- Russell, J. B., & Rychlik, J. L. (2001). Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*, 292(5519), 1119-1122. <https://doi.org/10.1126/science.1058830>
- Segura Sánchez, F., Echeverry, F., Patiño, A., & Mejía, A. (2007). Descripción y discusión acerca de los métodos de análisis de fibra y del valor nutricional de forrajes y alimentos para animales. *Vitae*, 14(1), 72-81. <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169815390011.pdf>
- Steele, M. A., AlZahal, O., Hook, S. E., Croom, J., & McBride, B. W. (2009). Ruminal acidosis and the rapid onset of ruminal parakeratosis in a mature dairy cow: A case report. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51(1), Artículo e39. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-51-39>
- Trujillo, A., & Uriarte, G. (2015). *Valor nutritivo de las pasturas*. <https://www.calameo.com/read/0043918943d568169a638>
- Van Kessel, J., & Russell, J. (1996). The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiology Ecology*, 20(4), 205-210. <https://coea.short.gy/PhqQRF>
- Van Soest, J. P. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant* (2<sup>nd</sup> ed.). Comstock.
- Wang, D., Tang, G., Wang, Y., Yu, J., Chen, L., Chen, J., Wu, Y., Zhang, Y., Cao, Y., & Yao, J. (2023). Rumen bacterial cluster identification and its influence on rumen metabolites and growth performance of young goats. *Animal Nutrition*, 15, 34-44. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405654523000872>
- Wilson, J. R., & Mertens, D. R. (1995). Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. *Crop Science*, 35(1), 251-259. <https://doi.org/10.2135/cropsci1995.0011183X003500010046x>
- Wood, P. D. (1967). Algebraic model of the lactation curve in cattle. *Nature*, 216, 164-165. <https://doi.org/10.1038/216164a0>
- Xiao, M., Zhang, C., Duan, H., Narbad, A., Zhao, J., Chen, W., Zhai, Q., Yu, L., & Tian, F. (2024). Cross-feeding of bifidobacteria promotes intestinal homeostasis: A lifelong perspective on the host health. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 10(1), Artículo e47. <https://doi.org/10.1038/s41522-024-00524-6>

- Yeoman, C. J., Fields, C. J., Lepercq, P., Ruiz, P., Forano, E., White, B. A., & Mosoni, P. (2021). In vivo competitions between *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, and *Ruminococcus albus* in a gnotobiotic sheep model revealed by multi-omic analyses. *mBio*, 12(2), Artículo e03533-20. <https://doi.org/10.1128/mbio.03533-20>
- Zhao, X., Zhang, Y., Rahman, A., Chen, M., Li, N., Wu, T., Qi, Y., Zheng, N., Zhao, S., & Wang, J. (2024). Rumen microbiota succession throughout the perinatal period and its association with postpartum production traits in dairy cows: A review. *Animal Nutrition*, 18, 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2024.04.013>