



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Uso de subproductos de la vinificación en dietas de rumiantes	2
2.2. Características del raspón de uva	3
2.3. Efecto de las proantocianidinas sobre la fermentación ruminal	4
2.4. Microbioma ruminal de los terneros y efecto de los subproductos de la uva en el mismo	7
2.5. Uso de la metagenómica para el estudio de la microbiota ruminal	11
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	12
4. MATERIAL Y MÉTODOS	12
4.1. Dietas y animales	12
4.2. Muestreo de líquido ruminal	13
4.3. Extracción de ADN del líquido ruminal de los terneros	13
4.4. Secuenciación masiva por nanoporos del ADN del líquido ruminal	14
4.5. Análisis bioinformático	14
4.6. Visualización de resultados y análisis estadístico	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1. Abundancia relativa	16
5.2. Alfa-diversidad	18
5.3. Beta-diversidad	19
5.4. Análisis de agrupamiento jerárquico	21
5.5. Análisis de abundancia diferencial	23
6. CONCLUSIONES	25
7. VALORACIÓN PERSONAL	26
8. BIBLIOGRAFÍA	26
ANEXO	33

1. RESUMEN

El raspón de uva, subproducto fibroso de la vinificación rico en proantocianidinas y otros compuestos bioactivos, puede desempeñar un papel relevante en la dieta de terneros al modular el microbioma ruminal, alterando el metabolismo proteico e inhibiendo la biohidrogenación. El objetivo principal del trabajo es estudiar el efecto de la inclusión de raspón (0 vs. 6%) sobre la microbiota ruminal en dos momentos de la finalización (día 20 y día 117) de terneros. Para ello, se extrajo el ADN microbiano contenido en el líquido ruminal, y se llevó a cabo su secuenciación masiva por nanoporos para su posterior análisis bioinformático.

Los resultados de este estudio revelaron que la inclusión de raspón en la dieta de los terneros modificó el microbioma ruminal principalmente en el primer muestreo, mientras que en el segundo los efectos fueron menores debido a la adaptación microbiana. Al inicio, el raspón aumentó la diversidad y variabilidad de la comunidad, favoreciendo hongos, protozoos y bacterias especializadas en la degradación de fibra, y reduciendo bacterias productoras de butirato sensibles a los polifenoles. Con el tiempo, los terneros sin raspón desarrollaron comunidades más diversas y estables, mientras que los que recibieron raspón evolucionaron hacia una microbiota más madura y especializada. Los análisis funcionales indicaron que el raspón promueve una mayor capacidad de regulación, respuesta al estrés y eficiencia metabólica en el ecosistema ruminal en el primer muestreo.

Este trabajo establece un precedente en el efecto del raspón de uva sobre la microbiota ruminal de terneros que habrá que estudiar en profundidad porque puede proporcionar información relevante para el desarrollo de estrategias más sostenibles y económicas en alimentación animal.

Abstract

The grape stem, a fibrous by-product of winemaking rich in proanthocyanidins and other bioactive compounds, may play a relevant role in finishing young bulls diets by modulating the ruminal microbiome, altering protein metabolism, and inhibiting biohydrogenation. The main objective of this study is to evaluate the effect of grape stem inclusion (0 vs. 6%) on ruminal microbiota at two finishing stages (day 20 and day 117) in finishing young bulls. To this end, microbial DNA from rumen fluid was extracted and subjected to nanopore-based massive sequencing for subsequent bioinformatic analysis.

The results of this study reveal that the inclusion of grape stem in finishing young bulls diets modified the ruminal microbiome mainly at the first sampling, whereas at the second sampling the effects were reduced due to microbial adaptation. Initially, grape stem increased community diversity and variability, favoring fungi, protozoa, and fiber-degrading bacteria, while reducing butyrate-producing bacteria sensitive to polyphenols. Over time, finishing young bulls without grape

stem developed more diverse and stable communities, whereas those receiving grape stem evolved toward a more mature and specialized microbiota. Functional analyses indicated that grape stem promotes greater regulatory capacity, stress response, and metabolic efficiency in the ruminal ecosystem at the first sampling.

This work sets a precedent for the effect of grape stem on finishing young bulls ruminal microbiota, which should be further investigated, as it may provide relevant insights for the development of more sustainable and cost-effective animal feeding strategies.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Uso de subproductos de la vinificación en dietas de rumiantes

La ganadería debe satisfacer la creciente demanda de alimentos de origen animal nutritivos y de alta calidad utilizando recursos de manera eficiente y siendo respetuosa con el bienestar animal y el medio ambiente. Los herbívoros son capaces de convertir los alimentos fibrosos en carne y leche de alto valor para la alimentación humana. Sin embargo, es necesario mitigar su contribución a las emisiones de gases de efecto invernadero y, entre otras estrategias, promover la circularidad adaptando las soluciones a los contextos locales.

Por otro lado, la ganadería está en el foco del debate sobre la competencia entre piensos y alimentos para el ser humano. Los componentes de los piensos que puedan ser comestibles para el hombre, estarán cada vez menos disponibles para el ganado. Para hacer frente a esta competencia, se pueden introducir subproductos fibrosos procedentes de la agroindustria a la dieta de los rumiantes. Dicho aprovechamiento es necesario en las agroindustrias para evitar problemas medioambientales y económicos. Sin embargo, su uso potencial se puede ver limitado por la disponibilidad y estacionalidad en la producción, además de en la necesidad de transportarlos y procesarlos antes de su utilización.

Son de especial interés los subproductos de la uva (*Vitis vinifera*). En 2024, España fue el país con mayor superficie dedicada al cultivo de uva para vinificación (930.000 ha; 13%) y la tercera productora a nivel mundial (OIV, 2024). En este contexto, España genera una gran cantidad de subproductos derivados de esta actividad, que pueden impactar de forma negativa tanto en el medio ambiente, como en los costes de la industria vitivinícola, ya que se generan unos 30 Kg de subproducto/100 L de vino (FEDNA, 2020).

Los subproductos normalmente utilizados en alimentación animal son el orujo (mezcla de raspón o escobajo, pulpa y semillas en proporciones variables), la pulpa u hollejo (resultante de separar las semillas del orujo) y la granilla desengrasada (constituida por las semillas separadas en el proceso anterior). Recientemente se está estudiando otro subproducto para ser incluido en las dietas de

animales: el raspón, el cual se puede obtener separado del resto de subproductos tanto en la vinificación como en la destilería. Es de especial interés su riqueza en compuestos fenólicos, entre los que se encuentran los flavonoides, concretamente las proantocianidinas (PAC) o taninos condensados, compuestos por monómeros de catequina y su isómero epicatequina, procianidinas y antocianinas; y otros compuestos no flavonoides como el resveratrol.

La Directiva 2008/98/EC del Parlamento Europeo y del Consejo prioriza las estrategias de gestión de residuos estableciendo que el consumo humano debe ser la primera opción para reutilizar los residuos alimentarios, seguida de la alimentación animal. No obstante, el alto contenido en fibra y lignina limita su uso como ingrediente en la industria alimentaria. En España es obligatorio eliminar el orujo de uva; bien a través de las destilerías, o mediante su entrega a un fabricante de vinagre (Real Decreto 584/2013). Por su parte, la granilla es empleada en la industria cosmética y farmacéutica, ya que su aceite tiene un alto valor comercial (FEDNA, 2020). Sin embargo, la alimentación animal se posiciona como la alternativa más viable para eliminar estos residuos alimentarios (San Martín et al., 2023).

No obstante, la falta de tipificación de estos subproductos dificulta su valoración nutritiva. Por ello, se estima que sólo un 3% de la producción nacional se destina a la alimentación animal. La utilización de otros subproductos de la uva ha permitido obtener buenos resultados productivos y económicos, al reducir el coste de las raciones, y mejorar la calidad nutracéutica de la carne y leche. Estos efectos se reflejan en mejoras de su color, contenido lipídico, estabilidad oxidativa y, en última instancia, potenciales beneficios para la salud humana (Fernández Mayer, 2021), ya que favorece la producción del colesterol “bueno”, o HDL.

Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos con el empleo del orujo de uva no son del todo extrapolables a otros subproductos, y que el raspón de uva como subproducto ha sido el menos estudiado en alimentación animal, sería recomendable plantear la realización de estudios específicos centrados en este subproducto ya que, además, el Real Decreto 584/2013 no se aplica a éste, pudiéndose utilizar con otros fines (Anastasiadi et al., 2012).

2.2. Características del raspón de uva

El raspón representa entre el 1,4% - 7% de la materia prima inicial de la uva; éste tiene un alto nivel de humedad (55 - 70%) (FEDNA, 2020), por lo que requiere de un secado para evitar su deterioro microbiano, el cual podría comprometer la salud del animal que lo consuma. Este proceso se puede llevar a cabo mediante desecado al sol en zonas con clima cálido; o mediante sistemas “flash dryer” (San Martín et al., 2023); aunque esta alternativa incrementa los costes de procesado.

Tiene un contenido en proteínas bajo (5% sobre el total de materia seca (MS)), contenidos medios de fibra neutro detergente (26% MS) y ácido detergente (25% MS), y altos de lignina (11% MS) y polifenoles (25 mg GAE/g) (San Martín et al., 2023). La dosis a incluir se ve condicionada por su alto contenido en lignina, la cual puede reducir la digestibilidad de la MS, ya que limita el acceso enzimático microbiano a la celulosa y hemicelulosa (San Martín et al., 2023). El raspón puede ser utilizado como ingrediente en los piensos de rumiantes, ya que, formulado en dosis adecuadas, puede resultar en una mejora en la eficiencia productiva de estos animales (San Martín et al., 2023).

El raspón tiene actividad antioxidante debido su composición fenólica (Anastasiadi et al., 2012), principalmente tiene proantocianidinas (PAC) como la catequina y epicatequina, y antocianinas como la malvidina-3-glucósido y otros derivados. Por otra parte, los ácidos caftárico y gálico son los ácidos fenólicos más representativos, y los derivados de quercetina los principales flavonoides monoméricos (Blackford et al., 2021).

Esparza et al. (2021) encontraron que la composición y concentración de polifenoles dependen de la variedad de la uva, la maduración, las condiciones climáticas (luz, temperatura y precipitaciones) y geográficas de crecimiento, las prácticas de cultivo y la añada.

2.3. Efecto de las proantocianidinas sobre la fermentación ruminal

Hay que tener en cuenta que las PAC pueden provocar efectos beneficiosos o perjudiciales a los animales dependiendo del animal, tipo de PAC, contenido en PAC y dieta, entre otros factores (Mueller-Harvey, 2006).

Estudios previos han señalado que estos compuestos pueden mejorar la actividad antioxidante de los rumiantes al inhibir el crecimiento de bacterias patógenas (Kafantaris et al., 2017), ya que las PAC tienen una fuerte capacidad antibacteriana que puede destruir las membranas microbianas mediante inhibición de sustratos enzimáticos e inactivación de proteínas de unión a la membrana (Guil-Guerrero et al., 2016). Estas PAC tienen un efecto bactericida más intenso en las bacterias Gram positivas que en las Gram negativas debido a la estructura de sus paredes celulares y la disposición de sus membranas externas, ya que estas modifican la permeabilidad de la membrana y la integridad de las paredes celulares de las bacterias del rumen (Vasta et al., 2019) (p. ej., la adición de orujo de uva puede inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como *Enterobacteriaceae* o *E. coli* en heces (Kafantaris et al., 2017)). Por otra parte, las PAC también disminuyen los niveles de la enzima acil-CoA sintetasa de cadena larga, la cual desempeña un papel importante en el metabolismo lipídico y en la vía metabólica de la biosíntesis de lipopolisacáridos (LPS). La reducción observada en la vía biosintética de los LPS podría estar relacionada con un crecimiento reducido de bacterias potencialmente patógenas para los humanos (p. ej., *Salmonella* o *E. coli*) como consecuencia de la

actividad antimicrobiana de las PAC (Biscarini et al., 2018). Por lo tanto, incluir una cierta proporción de estos subproductos en la dieta puede contribuir a reducir los procesos inflamatorios asociados a ciertas enfermedades (Li et al., 2024). Sin embargo, las PAC también pueden tener efectos tóxicos en el organismo cuando se administran en dosis elevadas (Martin et al., 2009).

Cada vez hay más evidencia de que los alimentos ricos en compuestos polifenólicos se pueden utilizar en dietas para rumiantes (Reddy et al., 2020; Vasta et al., 2019), ya que son capaces de modular el metabolismo de los nutrientes (Makkar, 2003) al interactuar con la microbiota ruminal optimizando la fermentación de carbohidratos (incluyendo la degradación de L-ramnosa (componente de la pectina)), la degradación de proteínas, el metabolismo lipídico y la producción de metano (CH₄) (Vasta et al., 2019). Sin embargo, en ingestas altas, los PAC se consideran antinutricionales, ya que pueden reducir la digestibilidad y la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) (Cheng et al., 2023).

Los estudios sobre la inclusión de orujo de uva en la dieta de los terneros se centran principalmente en el rendimiento durante el crecimiento (Tayengwa et al., 2020) y la eficiencia de utilización del N (Vinyard et al., 2021). Teniendo en cuenta el impacto de las PAC en el metabolismo ruminal del N a largo plazo (Makkar, 2003), cabría esperar una disminución en la concentración ruminal de NH₃-N y N. Sin embargo, esto no siempre ocurre, ya que en algunos estudios no se han encontrado diferencias significativas (Vinyard et al., 2021; Moate et al., 2014).

Las PAC se unen con una porción de la proteína en el rumen, reduciendo su disponibilidad para la fermentación ruminal produciendo un cambio en la ubicación del metabolismo y la digestión del N. Esto disminuye la actividad enzimática y microbiana, ralentizando la tasa de crecimiento de las bacterias hidrolíticas y reduciendo la producción de NH₃-N ruminal (Li et al., 2024). Además, el secuestro microbiano de péptidos, aminoácidos (AA) y NH₃-N en el rumen está modulado principalmente por la disponibilidad del adenosin trifosfato (ATP) (Hristov et al., 2005). Cuando el suministro de ATP es insuficiente, como en el caso de dietas con un alto contenido en fibra y compuestos polifenólicos, el uso de péptidos, AA y NH₃-N para la síntesis de proteínas microbianas es limitado (Vinyard et al., 2021). Por otra parte, se ha observado que estos subproductos mejoran la síntesis de vitamina B. La síntesis ruminal de vitamina B satisface el requerimiento vitamínico del animal y es un cofactor para varias enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos, carbohidratos y aminoácidos. Por ejemplo, el difosfato de tiamina (vitamina B1) es un cofactor esencial para una variedad de enzimas, como la transcetolasa, la piruvato deshidrogenasa, la piruvato descarboxilasa y la α-cetoglutarato deshidrogenasa. El fosfopantotenato (vitamina B5) por su parte, es un precursor esencial para la síntesis de la acetil-coenzima A, un cofactor en muchas vías metabólicas intermedias (Begley et al., 2001).

En cuanto al metabolismo lipídico, estos subproductos modifican procesos como la lipólisis y la biohidrogenación (BH) de ácidos grasos. Una parte de los lípidos es hidrolizada por lipasas microbianas liberando nutrientes como el glicerol, para su posterior utilización por las bacterias. Las PAC pueden inhibir la actividad de estas lipasas y disminuir la liberación de AGV (Li et al., 2019). Las PAC también pueden reducir la digestión de nutrientes al inhibir el crecimiento y la actividad de los microorganismos ruminales involucrados en la BH de AGV (Vasta et al., 2019) (p. ej., *Fibrobacter succinogenes*, *Bacteroides fibrisolvens* y *Ruminococcus albus*), y limitar la actividad de varias enzimas microbianas (p. ej., hemicelulasas y proteasas) (Jerónimo et al., 2016 ; Vasta et al., 2019), o rutas metabólicas (p. ej., la ruta del ciclo VIII del Ácido Tricarboxílico (TCA), el cual produce acetil-coenzima A para producir precursores de la síntesis de ácido acético y ácido butírico; o la fermentación del piruvato a acetona) (Ungerfeld, 2020).

Por otra parte, Vinyard et al. (2021) determinaron que un aumento de la proporción de orujo de uva en la dieta no tiene un efecto significativo en el pH ruminal ni en las proporciones molares de ácido valérico (aunque otros estudios demuestran que disminuye linealmente conforme aumenta la cantidad de estos subproductos en la dieta (Li et al., 2024)), ácido isobutírico, isovalérico y ácidos grasos de cadena ramificada. Asimismo, se ha reportado una reducción en el contenido de carbohidratos de fermentación rápida y un aumento concomitante de la fibra en la dieta, lo cual conlleva a una menor proporción de ácido propiónico en el rumen (Calsamiglia et al., 2008) y, en consecuencia, a un incremento en la relación acetato:propionato (Li et al., 2024). Dado que el ácido propiónico es el principal precursor gluconeogénico en rumiantes (Bergman, 1990), esta modificación puede limitar el suministro de glucosa y, por ende, es posible que el suministro calórico también se restrinja a medida que aumenta el contenido de orujo de uva en la dieta. Sin embargo, todavía se necesita conocer la medición directa de los intermediarios de BH en el líquido ruminal para comprender con mayor precisión su impacto en la alimentación del ganado vacuno de carne. (Vinyard et al., 2021).

Los lípidos restantes no metabolizados pasan a través del rumen y son digeridos y absorbidos en el intestino delgado. Generalmente, el género *Butyrivibrio* es el dominante; el cual está involucrado en pasos posteriores de BH tras la lipólisis (Vasta et al., 2019). Sin embargo, con la adición de estos subproductos se ha observado un cambio en los géneros dominantes hacia *Christensenellaceae* y *Pantoea*. (Li et al., 2024). Finalmente, también se ha visto que las PAC también pueden impedir la digestión de lípidos al unirse a las sales biliares (Li et al., 2019).

A pesar de los resultados documentados, la inclusión de estos subproductos en alimentación animal aún es limitada. Esto se relaciona en gran parte con la escasez de información sobre la proporción óptima de administración, ya que hay indicios de que el índice de crecimiento podría

verse comprometido más allá de un cierto umbral que todavía necesita evaluarse (Greenwood et al., 2012; Nudda et al., 2015). Así, Caetano et al. (2019) informaron de una disminución en la ganancia media diaria en terneros alimentados con un 30% de orujo de uva ensilado atribuido a la disminución de la digestibilidad total de los nutrientes y disminuyendo la concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ y N ruminal. Sin embargo, si eran alimentados tan solo con un 10% de orujo de uva ensilado, la ganancia media diaria aumentaba. Por su parte, Jerónimo et al. (2016) y Vasta et al. (2019) concluyeron que las PAC también pueden reducir la digestión de nutrientes al unirse irreversiblemente a estos si se administran en concentraciones superiores al 15% en la dieta. De hecho, Ianni et al. (2019) no observaron ningún impacto en la producción de AGV con una concentración del 10%, lo cual sugiere que los efectos podrían estar influenciados por el nivel de inclusión en la dieta, entre otros.

Las PAC y las ligninas de estos subproductos emergen como factores fundamentales que influyen en los procesos digestivos (Chikwanha et al., 2018). La lignina, al actuar como barrera física frente a los microorganismos del rumen (Li et al., 2024), dificulta la acción de enzimas fibrolíticas sobre la celulosa y la hemicelulosa (Moore y Jung, 2001), ralentizando así la tasa de paso y la digestibilidad aparente de la fibra detergente neutro (FDN), especialmente en dietas con altas inclusiones de orujo de uva. De hecho, Abarghwei et al. (2010) demostraron que, incluso tras eliminar la influencia de las PAC, la digestibilidad aparente de los nutrientes se mantuvo significativamente reducida. Este hallazgo reafirma que la lignina, de forma independiente, puede afectar negativamente el rendimiento productivo del ganado. Por lo tanto, es fundamental considerar tanto el contenido de PAC como el de lignina al incorporar el orujo de uva a la dieta.

Estos datos refuerzan la necesidad de determinar la proporción óptima de inclusión de estos subproductos, ya que esto garantizará su uso eficaz y seguro en alimentación animal.

2.4. Microbioma ruminal de los terneros y efecto de los subproductos de la uva en el mismo

El rumen es un órgano con ecosistema microbiano anaeróbico (Zhang et al., 2020) único en los rumiantes, que representa aproximadamente el 75% del volumen total del estómago de estos (Membrive, 2016). El tracto digestivo de los mamíferos está colonizado por un gran número de microorganismos, entre los que se incluyen bacterias, hongos, arqueas, protozoos y virus, que superan en número a las células del hospedador en cientos de veces, y constituyen lo que se conoce como el "segundo genoma" del animal (Barko et al., 2017).

La digestión y utilización del alimento en los rumiantes está principalmente relacionada con la capacidad de esta comunidad microbiana ruminal de fermentar los carbohidratos complejos como la celulosa y el almidón, así como proteínas y lípidos (Mizrahi et al., 2021) en nutrientes metabolizables como son los AGV de cadena corta, los cuales proporcionan hasta el 70% de las necesidades

energéticas del huésped (Mizrahi et al., 2021). Posteriormente, estos son absorbidos por el animal y utilizados en el metabolismo energético, así como en la síntesis de proteínas microbianas y complejos de vitamina B (Mizrahi et al., 2021; Zhang et al., 2020). Por lo tanto, los microorganismos ruminales desempeñan un papel doble: satisfacer la mayoría de los requerimientos nutricionales del hospedador y hasta el 90% de sus necesidades metabólicas (Mizrahi y Jami, 2018). Es decir, el microbioma ruminal es fundamental para la productividad, el bienestar y la salud de los rumiantes (Morgavi et al., 2013). La variabilidad de este microbioma entre individuos y a lo largo del tiempo ha sido investigada en numerosos estudios; de hecho, se sabe que la dieta altera la composición de la microbiota ruminal (Costa et al., 2018).

Las interacciones microbianas ruminales basadas en dietas con diferentes proporciones de subproductos de la uva son complejas (Li et al., 2024). Algunos estudios como el de Biscarini et al. (2018) encontraron que la riqueza microbiana apenas se ve afectada en la suplementación de dietas con estos subproductos; sin embargo, la diversidad microbiana aumenta claramente ya que se ven afectados significativamente filos, familias y géneros bacterianos ruminales. No obstante, otros estudios no han detectado cambios significativos en la estructura microbiana (Li et al., 2024) lo que pone de manifiesto la necesidad de profundizar en la investigación sobre este tipo de dietas y su efecto sobre la microbiota ruminal.

La composición microbiana ruminal presenta una mayor proporción de *Bacteroidetes*, seguidos de *Firmicutes* (Wang et al., 2021; Pitta et al., 2016). Los *Bacteroidetes* están especializados en la expresión de enzimas degradadoras de polisacáridos, regulando así la digestión y absorción de carbohidratos (Li et al., 2017; Gharechahi et al., 2023). Por su parte, los *Firmicutes* participan en la digestión y absorción de proteínas, y la fermentación de la fibra, mediante la producción de enzimas libres, celulosomas o complejos multienzimáticos (Gharechahi et al., 2023). Esta colaboración entre filos facilita la degradación de polisacáridos y la producción de ácido láctico y ácido butírico, que pueden ser utilizados posteriormente por el hígado y los tejidos musculares (de Vos et al., 2022). Sharma et al. (2018) sugirieron que esta colaboración entre *Firmicutes* y *Bacteroidetes* influye en el almacenamiento de grasa al regular la eficiencia de la absorción de energía. Biscarini et al. (2018) determinaron que las dietas con un alto contenido en orujo de uva disminuyen esta colaboración.

En conjunto, estos resultados indican que las principales bacterias ruminales están estrechamente relacionadas con la digestibilidad aparente de los nutrientes y con los parámetros de fermentación ruminal (Li et al., 2024). Al analizar taxones específicos, se ha observado que ciertos géneros como *Bacteroidales*, *Ruminiclostridium* y *Eubacterium* aumentaron su abundancia dentro de la microbiota ruminal tras la inclusión de subproductos de uva en la dieta. Por ejemplo, *Ruminiclostridium cellulyticum* tiene la capacidad de degradar los polisacáridos ramificados presentes

en el orujo de uva (Gao et al., 2016), y se demostró que los oligosacáridos resultantes se incorporan al citoplasma de las células para posteriormente degradarse en glucosa y glucosa-1-fosfato (Ravachol et al., 2016).

En otro estudio, una dieta que contenía 8% de orujo de uva incrementó la abundancia de *Prevotella 1*, *Ruminococcus 2* y *Sharpea*, y disminuyó las *Methanobrevibacter* productoras de CH₄ (Cheng et al., 2023). El rumen es el sitio primario de producción de CH₄, mientras que el intestino posterior contribuye solo con el 6-14% de la producción (Immig, 1996). El CH₄ entérico de los rumiantes representa el 73% de las emisiones del ganado (Rodrigues, 2016), y es el equivalente al 2-12% de la ingesta de energía digestible del huésped (Johnson y Johnson 1995), comprometiendo la eficiencia alimenticia (Zhang et al., 2020). Se sabe que muchos de los microorganismos metanógenos pertenecen al dominio *Archaea*, ya que son las únicas productoras de CH₄ en el tracto gastrointestinal (Janssen y Kirs, 2008). El género predominante es *Methanobrevibacter*, capaz de convertir el H₂ o el ácido acético en CH₄ (Leahy et al., 2013), sin embargo, el mecanismo de acción aún requiere de investigaciones más profundas. Las PAC que contienen estos subproductos también parecen inhibir los metanógenos y protozoos (Moate et al., 2014), sin embargo, no está claro en qué dirección, ya que se obtuvieron resultados dispares en diferentes análisis (Biscarini et al., 2018). Aunque no se han realizado estudios exhaustivos, Ungerfeld (2015) y Zhang et al. (2020) encontraron que maximizar el H₂ metabólico del CH₄ hacia la formación de ácido propiónico aumentaría la eficiencia del rendimiento de los rumiantes al disminuir la relación acetato:propionato y reduciría el impacto ambiental.

Liu et al. (2022) encontraron cambios significativos en otras bacterias ruminales: *Succinivibrio* y *Fibrobacter succinogenes*. *Succinivibrio*, clasificada dentro de la clase *Negativicutes*, es la principal bacteria involucrada en la vía del ácido succínico, precursor del ácido propiónico. La adición de 10% de orujo de uva aumenta la relación acético - propiónico (Liu et al., 2022) lo que puede reducir la eficiencia de la utilización de energía dietética; sin embargo, también aumenta su relación con el acético, el isobutírico, el butírico y la producción de AGV totales, mejorando así la salud del ganado, la digestibilidad de la materia seca, y la disminución del N urinario (Li et al., 2024). *Fibrobacter succinogenes*, perteneciente al género *Fibrobacterium*, presenta una proteína de membrana externa que presenta alta capacidad para unirse a la celulosa, jugando un papel crucial en la degradación de la fibra. Un contenido elevado de lignocelulosa promueve el crecimiento de *Fibrobacterium*, aumentando la producción de AGV esenciales para el mantenimiento, reproducción y crecimiento del animal (Li et al., 2022). Incluir 20% de orujo de uva en la dieta aumenta la abundancia de *Fibrobacterium* en el rumen (Gharechachi et al., 2023; Ransom-Jones et al., 2012). Esto puede tratarse de una estrategia metabólica que emplea el ganado vacuno para adaptarse a dietas con

mayor contenido de lignocelulosa. Sin embargo, la proliferación de bacterias fibrolíticas puede aumentar la relación acético:propiónico, lo que puede reducir la eficiencia de la utilización de energía dietética.

En definitiva, los pocos estudios que hay muestran resultados dispares. Yanza et al. (2021) concluyeron que las proantocianidinas pueden ser compuestos bioactivos beneficiosos en dietas de rumiantes cuando se incluyen en niveles inferiores al 3% de la MS de la dieta mientras que Banerjee et al. (2018) concluyeron que cuando el orujo de uva se incrementa al 20% en la dieta, se observa una disminución de la estabilidad de la estructura microbiana ruminal que altera la composición de la microbiota y modifica taxones clave. Los taxones clave influyen significativamente en las comunidades y funciones microbianas, independientemente de la abundancia de microbiota en las dimensiones espaciales y temporales; sin embargo, a pesar de estos cambios, las interacciones positivas entre el orujo de uva y los microorganismos ruminales mejoran la eficiencia metabólica general.

A nivel funcional, los genes expresados están principalmente relacionados con el transporte de membrana, metabolismo de carbohidratos, replicación y reparación, motilidad bacteriana (p. ej., proteína de quimiotaxis aceptora de metilo), la digestión y absorción de proteínas (p. ej., enzima dipeptidil-peptidasa 4), el transporte de nutrientes (p. ej., proteína permeasa del sistema de transporte de membrana ABC miembro de una superfamilia presente en todos los filos desde procariontes hasta mamíferos), y el metabolismo de arginina y prolina (Biscarini et al., 2018).

Por lo tanto, el rumen es un entorno altamente dinámico debido a la notable capacidad de adaptación de los microorganismos ruminales a la presencia de compuestos bioactivos presentes en las dietas (Patra y Saxena, 2021). La exposición continuada y gradual a dietas que contienen compuestos polifenólicos estimula la selección natural de poblaciones microbianas resistentes y, en algunos casos, capaces de degradar parcialmente dichos compuestos para ser utilizados posteriormente como fuente de energía por el hospedador (Min et al., 2003). Diversos ensayos *in vivo*, como el de Molina-Alcaide et al. (2010), han demostrado que la incorporación de subproductos vitivinícolas en la dieta de los rumiantes no compromete la digestibilidad de los nutrientes ni afecta negativamente a la producción del animal una vez superado el período inicial de adaptación a una dieta bien formulada.

Sin embargo, teniendo en cuenta que los resultados obtenidos con el empleo de estos subproductos no son del todo extrapolables a otros subproductos, y que los trabajos realizados en cebo de rumiantes en general, y de terneros en particular, son muy escasos, se planteó la necesidad de desarrollar investigaciones específicas utilizando el raspón de uva como subproducto.

2.5. Uso de la metagenómica para el estudio de la microbiota ruminal

En los últimos años, la aparición y adopción de técnicas de secuenciación de alto rendimiento (NGS), capaces de generar varias gigabases (Gb) en pocos días, han abierto nuevas perspectivas en múltiples áreas de la genómica. Bajo este paraguas se incluyen las tecnologías no basadas en Sanger. La secuenciación de segunda generación (p. ej., Illumina) utiliza superficies de fijación de moléculas de DNA, que permiten la secuenciación en paralelo de millones de secuencias de DNA (Slatko et al., 2018), reduciendo drásticamente el tiempo y coste del genotipado, y la secuenciación de genomas completos (Pettersson et al., 2009). Estas plataformas incorporan una etapa de PCR para amplificar el material genético y destacan por su baja tasa de error y alto rendimiento, lo que las hace idóneas para resecuenciación, RNA-seq, detección de SNPs y estudios metagenómicos.

La secuenciación de tercera generación se fundamenta en la idea de eliminar la etapa de PCR, y tratar de realizar la propia secuenciación a partir de una única molécula de ADN. Al mismo tiempo que se trata de abaratar los costes, se obtienen lecturas de secuencia más largas (10-30 Kb), que facilitan el posterior ensamblado de secuencias y ampliando sus aplicaciones, como la detección de grandes variaciones en la estructura de los cromosomas. Esta tecnología requiere una cantidad relativamente grande de DNA (entre 250 y 5.000 ng, en función de la tecnología). Las dos tecnologías comerciales más extendidas son SMRT (Single-Molecule Real-Time; PacBio), basada en detección de fluorescencia en tiempo real (Eid et al., 2009), y la secuenciación por nanoporos (ONT), que infiere la secuencia a partir de cambios en la corriente iónica al atravesar un nanoporo (Branton et al., 2008). Un nanoporo es un pequeño agujero del orden de un nanómetro en su diámetro interno. Los agujeros pueden ser creados por proteínas que perforan membranas (nanoporos biológicos) o se hacen sobre materiales sólidos tales como silicón y grafeno. Las lecturas largas han impulsado el ensamblaje de genomas virales y bacterianos con alta continuidad (Goldstein et al., 2019). Su desventaja clásica es una tasa de error por base mayor que Illumina (Bleidorn, 2016), que a menudo se mitiga mediante ensamblajes híbridos o corrección con lecturas cortas (Jung et al., 2019).

Este tipo de secuenciaciones permiten el estudio de la microbiota generalmente abordadas mediante dos aproximaciones: Metagenómica y secuenciación del rRNA 16S/ITS. La secuenciación del 16S rRNA (bacterias/arqueas) e ITS rRNA (hongos) son enfoques amplicón-dirigidos. Amplifican una región marcador (p. ej., V3-V4 del 16S y/o el espaciador interno transcrito, ITS) y caracterizan la composición taxonómica comparando las secuencias con bases de datos específicas. Como ventajas presenta un menor coste, menos DNA inicial necesario, análisis bioinformáticos con flujos de trabajo (pipelines) más estandarizados, aunque presenta como inconvenientes ciertos sesgos de PCR/cebadores, influencia del número de copias del gen marcador, y resolución taxonómica limitada (a menudo hasta género/especie según región y base de datos). Además no miden directamente la función, y cuando se necesita funcionalidad se recurre a inferencias (p. ej., PICRUSt), con la

incertidumbre asociada. El análisis metagenómico mediante “Whole-Metagenome Shotgun sequencing” (metagenómica “shotgun”) secuencía todo el ADN presente sin amplificación de un locus concreto. Permite obtener el perfil taxonómico con mayor resolución (especie/cepa con suficiente cobertura), el análisis funcional directo (genes, vías metabólicas, resistoma, viruloma, CAZymes, etc), y el ensamblaje y recuperación de MAGs (metagenome-assembled genomes), así como el análisis de variación intra-poblacional. Como inconvenientes presenta un mayor coste y es necesario una mayor profundidad de lectura, además de la necesidad de filtrar ADN huésped, y un análisis bioinformático más exigente.

En general, las lecturas largas (PacBio/ONT), solas o en estrategias híbridas, mejoran la contigüidad de ensamblajes metagenómicos y la resolución de cepas, a costa de un pipeline y control de calidad más complejos.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo es estudiar el efecto de la inclusión en la dieta de raspón de uva sobre la microbiota ruminal de terneros en dos momentos distintos del cebo, ya que esta es capaz de adaptarse tras un tiempo a niveles elevados de fibra y proantocianidinas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los procedimientos y muestreos realizados durante el ensayo cumplen los principios éticos de protección de los animales utilizados para experimentación requeridos en el CITA y se adaptan a la normativa vigente (Real Decreto 53/2013) y han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del CITA (Referencia 2021-11).

El ensayo se llevó a cabo en la Finca Experimental de la Garcipollera (CITA) (42° 37' N, 0° 30' O, 945 m sobre el nivel del mar (m s.n.m)) y los análisis de las muestras y desarrollo del trabajo en el laboratorio del CITA de Zaragoza (41° 42' N, 0° 49' O, 216 m s.n.m.).

4.1. Dietas y animales

En septiembre de 2023 se secaron al sol 4 toneladas de raspón de vid de una mezcla de variedades (blanco, garnacha y tempranillo) procedentes de la destilería San Valero (Cariñena, Zaragoza). Para ello, se extendieron en una gran superficie hormigonada y voltearon diariamente durante 10 días. Una vez seco se analizó [proteína bruta (PB: 7%), fibra neutro detergente (FND): 31%, fibra ácido detergente (FAD): 26%, lignina: 8%, polifenoles: 70 mg equivalentes (eq.) ácido tánico/g MS y PAC totales: 136 g eq. PAC raspón/Kg MS; PAC libres: 57 g eq. PAC raspón/Kg MS; PAC ligados a proteína: 62 g eq. PAC raspón/kg MS; PAC ligados a fibra: 17,3 g eq. PAC raspón/kg MS]. Una vez seco, el raspón se molió en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza con molino de martillos con tamiz de 2,5 cm (según su recomendación).

Se formularon dos piensos isoenergéticos (1,04 UFC/kg de materia fresca (MF)) e isoproteicos (11,2% PB en MF) con diferente contenido en raspón (0% vs. 6%). Dada el bajo contenido en PB y elevado de fibras se eligió utilizar paja para sustituir el raspón en el pienso y modificar lo mínimo posible el resto de los ingredientes de estos. Los principales ingredientes del pienso 0% raspón fueron: maíz (51,8%), trigo (14,9%), DDGs (8,0%), paja (6%) y cebada (5%); mientras que los del pienso 6% raspón fueron: maíz (51,8%), trigo (14,9%), DDGs (8%), cascarilla de soja (6,8%), raspón (6%) y cebada (5%) (Tabla 1).

Para la realización de este estudio, se emplearon diecisiete terneros de raza Parda de Montaña procedentes del rebaño experimental durante sus cuatro últimos meses del cebo (junio a octubre 2024). Al inicio del ensayo, los terneros se asignaron aleatoriamente a dos grupos equilibrados por peso ($304 \pm 24,3$ kg) y edad (232 ± 9 , d). La mitad recibió pienso con 0% raspón y la otra mitad pienso con 6% raspón (n=9) mediante dos estaciones de alimentación DELPRO (DELPRO Herd Management 5.3, DeLaval). Todos recibieron paja a voluntad (fuente de fibra larga) y agua a libre disposición.

4.2. Muestreo de líquido ruminal

A los 20 (muestreo 1) y a los 117 días (muestreo 2) de alimentarse los terneros con las dietas experimentales, se realizó un muestreo en el que se obtuvo líquido ruminal de cada ternero. Los terneros se inmovilizaron en un potro de contención donde se les realizaron dos extracciones de aproximadamente 200 mL de líquido del saco ventral del rumen mediante una sonda esofágica conectada a una bomba de vacío; el líquido obtenido en la primera extracción se descartó para evitar la posible contaminación por saliva que podría haber quedado alojada en el interior de la sonda al atravesar la boca y el esófago del animal, mientras que el de la segunda extracción se filtró a través de una gasa quesera. Se midió el pH con un pH metro portátil, y se tomó una alícuota para el estudio del microbioma. Dicha muestra se congeló manteniéndose a -80°C hasta la extracción del ADN.

4.3. Extracción de ADN del líquido ruminal de los terneros

Para el análisis metagenómico se seleccionaron doce animales que recibieron pienso con 0% (n = 6) y 6 % (n = 6) raspón. Ambas alícuotas, la obtenida en el muestreo a los 20 días, y la obtenida a los 117 días de alimentarse con las dietas experimentales, se utilizaron para obtener un total de 24 metagenomas.

La extracción de ADN del microbioma ruminal se realizó a partir de 300 mg de cada muestra utilizando el kit Quick - Start Protocol DNeasy PowerSoil Pro (QIAGEN), que es un método mecánico. Este kit está indicado para secuenciaciones con ADN intacto de gran peso molecular (longitud) como la secuenciación por nanoporos. La calidad y cantidad de ADN extraído se comprobó mediante espectrometría con el espectrofotómetro (Implen) y mediante fluorimetría en Qubit4 (Invitrogen).

4.4. Secuenciación masiva por nanoporos del ADN del líquido ruminal

La secuenciación del metagenoma se llevó a cabo a partir de 1 µg de ADN, mediante secuenciación masiva por nanoporos de Oxford Nanopore Technologies (ONT). Se utilizó el kit “Ligation sequencing gDNA – Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK – NBD114.24)” de ONT, que utiliza la química V14 que permite una mayor calidad de lecturas que químicas anteriores, llegando hasta una calidad superior a Q20 en secuenciación simple (no pareada). Se prepararon 12 muestras por librería en multiplex con etiquetas específicas (adaptadores que identifican las diferentes muestras) para cada muestra.

Para la secuenciación, se utilizaron celdas de flujo (Flow cells) versión R10.1, específicos para la química V14, en las cuales se cargaron 150 ng de la librería en multiplex con etiquetas. Se utilizó un secuenciador portátil MinION (ONT). La secuenciación se realizó a tiempo real utilizando el algoritmo de asignación de bases que tiene mayor precisión (Superior accuracy; SUP) a partir del software MinKNOW, clasificando cada lectura en cada una de las 12 muestras secuenciadas por celda de flujo. Además, se eliminaron las etiquetas específicas de muestra, así como aquellas lecturas de una longitud inferior a 200 pares de bases (pb) o una calidad inferior a 10 ($Q < 10$). El tiempo de secuenciación para cada librería fue de 24h, recargándose la celda de flujo con 150 ng de librería, y secuenciando 48h más adicionales. Finalmente, tras la secuenciación se obtuvieron las lecturas en archivos en formato FASTQ. Igualmente, el programa MinKNOW de ONT genera un archivo resumen de salida donde te indica el número de lecturas y Gb secuenciados, así como longitud media de las lecturas para cada muestra.

4.5. Análisis bioinformático

Dada la existencia de secuencias de ADN del hospedador secuenciado, se implementó un paso de filtrado posterior a la secuenciación. Para ello, se utilizó el software Minimap2 en Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) para alinear las lecturas largas contra el genoma de referencia de *Bos taurus* de NCBI (Genome assembly ARS-UCD2.0). Se descartaron sistemáticamente todas las secuencias que alinearon con el genoma de referencia, reteniéndose únicamente aquellas lecturas que no se alinearon. Tras los filtrados iniciales ($Q > 10$, longitud secuencias > 30 , y eliminación de las secuencias de *Bos taurus*) se llevó a cabo un control de calidad con Nanoplot (De Coster, 2018) en Galaxy. Las lecturas se analizaron con el flujo de trabajo para lecturas largas en SqueezeMeta v1.6.2 (Tamames y Puente-Sánchez, 2019), que ejecuta DIAMOND BLASTx frente a las bases de datos NCBI-nr, COG y KEGG. NCBI-nr es la base de datos no redundante de proteínas del NCBI, utilizándose en metagenómica para asignación taxonómica por homología. COG (*Clusters of Orthologous Groups*) es una base de datos que agrupa proteínas ortólogas en familias y las clasifica en categorías funcionales (códigos de una letra), útil para inferir función por homología. KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) es un recurso integrado que relaciona genes con rutas y redes biológicas; organiza

ortólogos en KOs, rutas (PATHWAY), módulos y jerarquías (BRITE), e incluye compuestos y reacciones. En metagenómica, COG resume funciones generales a nivel de familias de proteínas, mientras KEGG permite mapear genes a vías metabólicas y de señalización y estimar el potencial funcional. Combinadas, ambas bases de datos facilitan la anotación y el resumen funcional de comunidades microbianas.

SqueezeMeta implementa un algoritmo del menor ancestro común (LCA) para determinar el taxón de consenso de cada lectura. El flujo de trabajo alinea cada lectura contra las bases de referencia mencionadas anteriormente y proporciona el número de copias de cada lectura por nivel taxonómico, COG o KEGG presente en la muestra. Las funciones génicas se anotaron usando el mejor alineamiento (*best hit*) por encima de un umbral mínimo.

4.6. Visualización de resultados y análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se consideraron diferentes escenarios:

- i) Comparación de inclusión de raspón 0 y 6% en el muestreo 1.
- ii) Comparación de inclusión de raspón 0 y 6% en el muestreo 2.
- iii) Comparación de muestreo 1 y 2 en los terneros con inclusión de raspón 0%.
- iv) Comparación de muestreo 1 y 2 en los terneros con inclusión de raspón 6%.

Se filtraron los datos según abundancia, manteniéndose aquellos que tenían al menos recuentos en al menos el 1% de las muestras. Para determinar la composición microbiana, los taxones se agruparon a nivel de género y filo, mientras que los genes se agruparon según COG y ortología KEGG (KO). Se utilizaron las abundancias relativas (AR) para visualizar e interpretar la composición de esta microbiota. Se calculó la alfa-diversidad observada, Chao 1 (corrige la riqueza observada usando niveles taxonómicos raros, no mirando equitatividad), el índice de Shannon (definido como la riqueza de especies ponderada por su abundancia y equitatividad) e inversa de Simpson (diversidad ponderada por dominancia, muy influida por los niveles taxonómicos comunes). La corrección por rarefacción se realizó utilizando el recuento de lecturas correspondiente al percentil 10 (Q10), y la significación estadística se evaluó con la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (Mann–Whitney). En este trabajo ninguna muestra fue eliminada por tener un recuento de lecturas inferior al percentil 10. La alfa-diversidad y la curva de rarefacción se calculó con los paquetes phyloseq, vegan, ggplot2, ggpubr y reshape2.

La beta-diversidad se estimó mediante análisis de componentes principales (PCA) y PERMANOVA para evaluar diferencias en los 4 escenarios. Para abordar la naturaleza composicional de los datos, se aplicó la transformación CLR usando el paquete de R microbiome. El PCA se realizó con la función prcomp del paquete stats y la PERMANOVA con los paquetes vegan y RVAideMemoire.

Posteriormente, se realizó un análisis de agrupación jerárquica, visualizando la agrupación de muestras mediante un dendrograma y visualización en forma de mapa de calor (heatmap) según los

niveles (género, filo, categorías COG y ortologías KEGG (KO)), utilizando el algoritmo de agrupamiento Ward, que analiza la varianza de las muestras con el fin de agruparlas. El número óptimo de *clusters* para cada escenario y grupo de análisis se estimó aplicando el algoritmo *k-means*, y evaluando la cohesión y separación de los grupos mediante el índice de *Silhouette*. Como medida de distancia se utilizó la euclidiana, que mide la distancia entre dos muestras en un espacio euclidiano. Se utilizaron los paquetes de R *phyloseq*, *microbiome*, *cluster*, *ggplot2*, *scales*, *vegan*, *scores*, *vegdist* y *pheatmap*.

Por último, se evaluó la abundancia diferencial a nivel de taxones y genes (género, filo, categorías COG y ortologías KEGG) utilizando el paquete DESeq2, tras aplicar un filtro de prevalencia del 1% para eliminar niveles raros. DESeq2 ajusta modelos lineales generalizados con distribución binomial negativa, estima factores de tamaño para la normalización (empleando el método *poscounts*).

La significación estadística se evaluó mediante pruebas de Wald, y los p-valores se ajustaron por comparaciones múltiples con Benjamini–Hochberg (FDR). Se consideraron significativos aquellos con $p\text{-FDR} < 0,05$ y con una abundancia relativa (Fold Change, FC) superior a 2 entre las condiciones comparadas. Además, para los términos KEGG y COG significativos se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento funcional, a fin de identificar rutas metabólicas y procesos biológicos sobrerrepresentados. Para ello, se utilizó como lista de referencia (*background*) la lista completa de términos KEGG y COG detectados en el metagenoma de referencia, mientras que como conjunto de términos de interés se consideraron únicamente aquellos términos asociados a los genes diferenciales significativos. El enriquecimiento se evaluó mediante el test de Fisher, seguido de corrección por FDR (Benjamini–Hochberg). Los términos y rutas con $p\text{-FDR} < 0,05$ se consideraron significativamente enriquecidos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calidad de las secuencias obtenidas tras los filtrados de calidad se resume en la Tabla suplementaria 2. Brevemente, el número de secuencias por muestra varió entre 0,32 y 3,43 millones, siendo la mediana de 1,60 millones de secuencias. La calidad promedio de las secuencias fue de 19,3 (Q). La longitud media de las secuencias fue de 956,42 pb, con una media de 1,25 Gb secuenciadas por muestra (máximo de 2,88 Gb y el mínimo de 0,44 Gb).

5.1. Abundancia relativa

La abundancia relativa de los niveles taxonómicos de filo y género se muestra en los siguientes histogramas. Así, la inclusión de raspón en el muestreo 1 muestra diferencias a nivel composicional tanto a nivel de filo (p. ej., *Bacillota* y *Bacteroidota*) como de género (p. ej., *Roseburia*); sin embargo, se observa una menor modificación de la abundancia de las bacterias en el muestreo 2 (Figura 1).

En los terneros del raspón 0%, el muestreo determinó diferencias a nivel composicional tanto a nivel de filo (p. ej., *Bacillota* y *Bacteroidota*) como de género (p. ej., *Roseburia*) pudiendo ser debidas

al momento productivo del animal y/o otros condicionantes fisiológicos y/o ambientales; sin embargo, en el raspón 6%, el muestreo parece que afectó en menor medida a la abundancia relativa de las bacterias (Figura 2).

Figura 1. Abundancia relativa, indicando los 15 niveles taxonómicos más abundantes, agrupados por porcentaje de inclusión de raspón en los muestreos según filo y género.

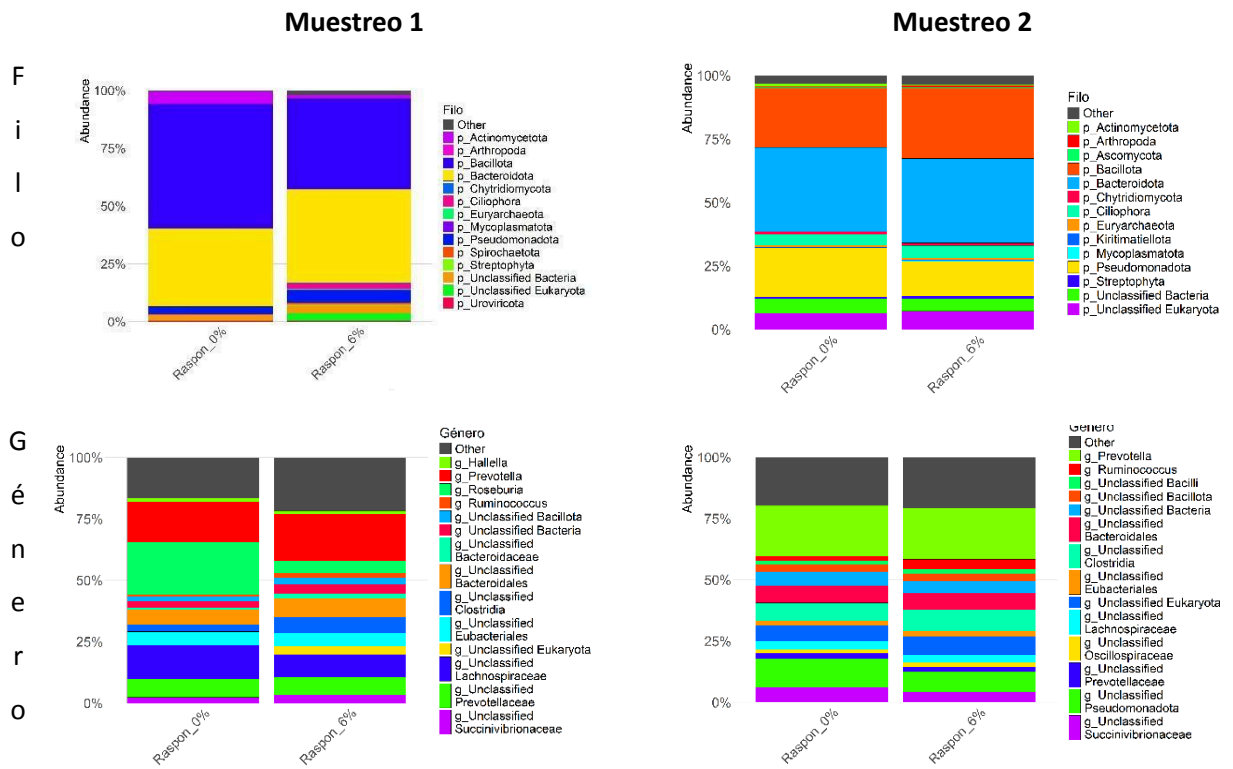
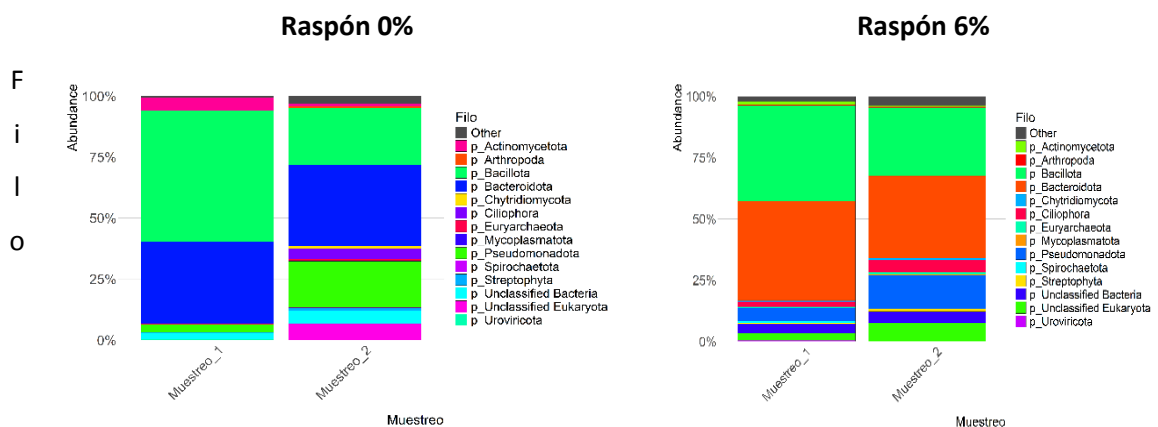
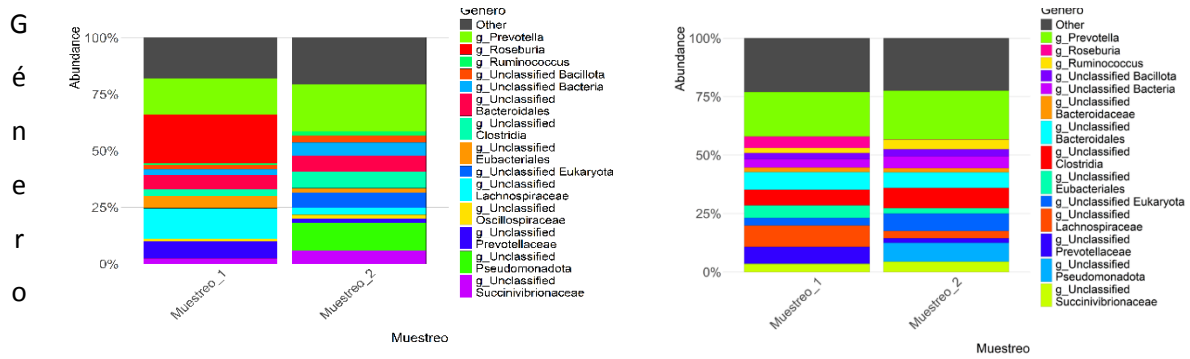


Figura 2. Abundancia relativa, indicando los 15 niveles taxonómicos más abundantes, para los terneros raspón 0% y raspón 6%, según filo y género.



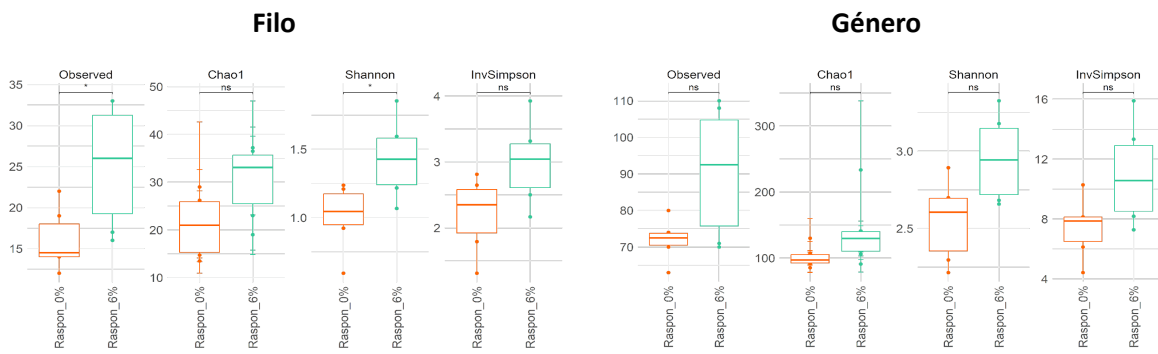


5.2. Alfa-diversidad

Los análisis de alfa-diversidad mostraron significación para la inclusión de raspón en el muestreo 1 sólo a nivel de filo (Figura 3), aunque siempre se observó una mayor variabilidad en el tratamiento que incluye raspón 6% (incluido en COG y KEGG; Figura suplementaria 1). El incremento de la alfa-diversidad debida a la inclusión de raspón en el primer muestreo concuerda con los resultados de Biscarini et al. (2018) en terneros lecheros alimentados con dietas suplementadas con orujo de uva.

Sin embargo, en el muestreo 2 no se encontraron diferencias debidas a la inclusión de raspón que podría deberse a la adaptación de los animales raspón 6% a dietas con mayor contenido en lignina y compuestos polifenólicos tras un período de exposición. Estos compuestos estimulan la selección natural de poblaciones microbianas resistentes que, en ocasiones, son capaces de degradarlos parcialmente para ser utilizados posteriormente como fuente de energía por el hospedador (Min et al., 2003). Estos resultados concuerdan con la ausencia de efecto encontrada en la alfa-diversidad microbiana en terneros alimentados con dietas con 0, 10 y 20% de orujo de uva seco durante 4 meses (Li et al., 2024).

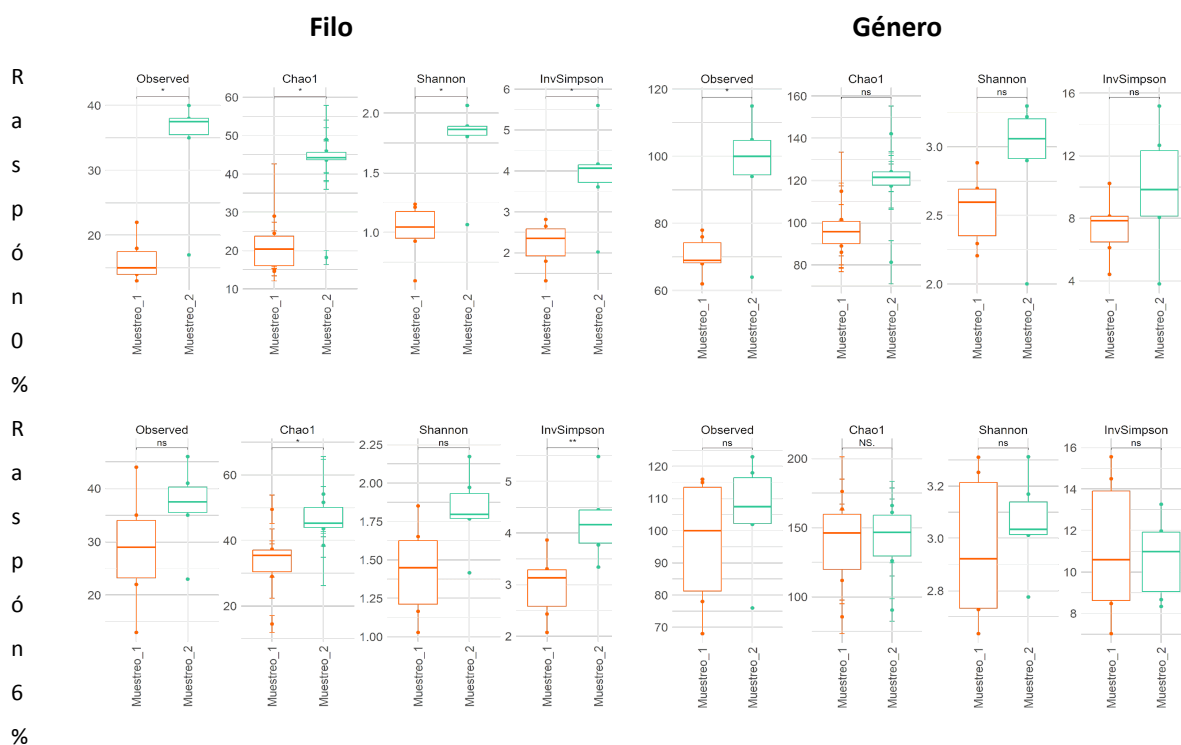
Figura 3. Alfa-diversidad de los diferentes niveles taxonómicos según la inclusión de raspón en el muestreo 1. * indica diferencias entre los grupos ($p < 0,05$), NS indica ($p > 0,05$).



En los terneros raspón 0%, se encontraron diferencias significativas entre muestreos para los niveles de filo presentando muestreo 2 una mayor alfa-diversidad (Figura 4). En terneros raspón 6%,

aparecieron estas mismas diferencias. Una mayor diversidad de la microbiota ruminal suele favorecer la adaptación del animal al ambiente (mayor estabilidad ante perturbaciones) y a cambios dietéticos (menor riesgo de disbiosis) gracias a una mayor redundancia funcional (Weimer., 2015), lo cual es beneficioso. Los motivos por los cuales se incrementó la alfa-diversidad entre muestreos no está claro ya que podría ser por la edad (Costa-Roura et al., 2022) o podría deberse a motivos ambientales. En el primer muestreo (que tuvo lugar en julio) los terneros estuvieron expuestos a altas temperaturas durante varios días lo que pudo reducir la diversidad como se ha encontrado en novillas (Tajima et al., 2007).

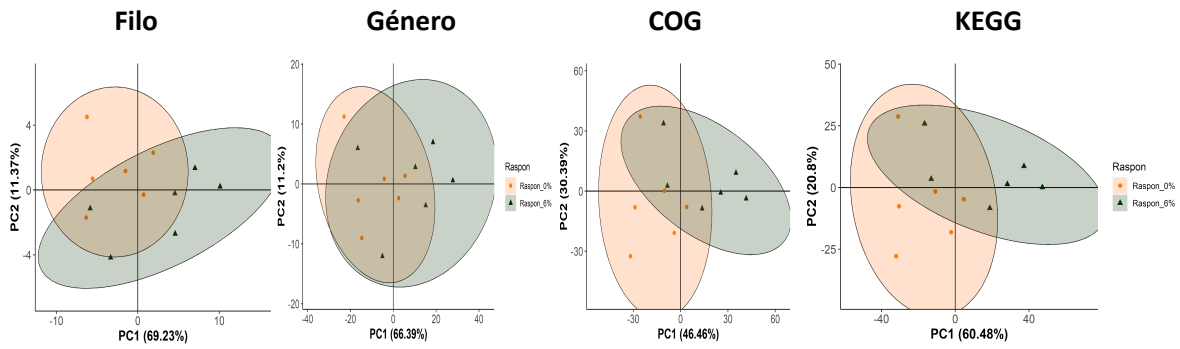
Figura 4. Alfa-diversidad de los diferentes niveles taxonómicos a nivel de filo y género en los terneros raspón 0% y 6%. * indica diferencias entre los grupos ($p < 0,05$), NS indica ($p > 0,05$).



5.3. Beta-diversidad

Los resultados de beta-diversidad se representaron en un gráfico PCA que estima la distancia entre las muestras. El gráfico muestra los dos primeros componentes principales junto con la proporción de la variación total que explican. La inclusión de raspón en el muestreo 1 afectó a los niveles COG ($p = 0,023$) y KEGG ($p = 0,04$) y tendió a afectar a los taxones a nivel de filo ($p = 0,09$) y género ($p = 0,08$) (Figura 5) pero no en el muestreo 2 (datos no mostrados).

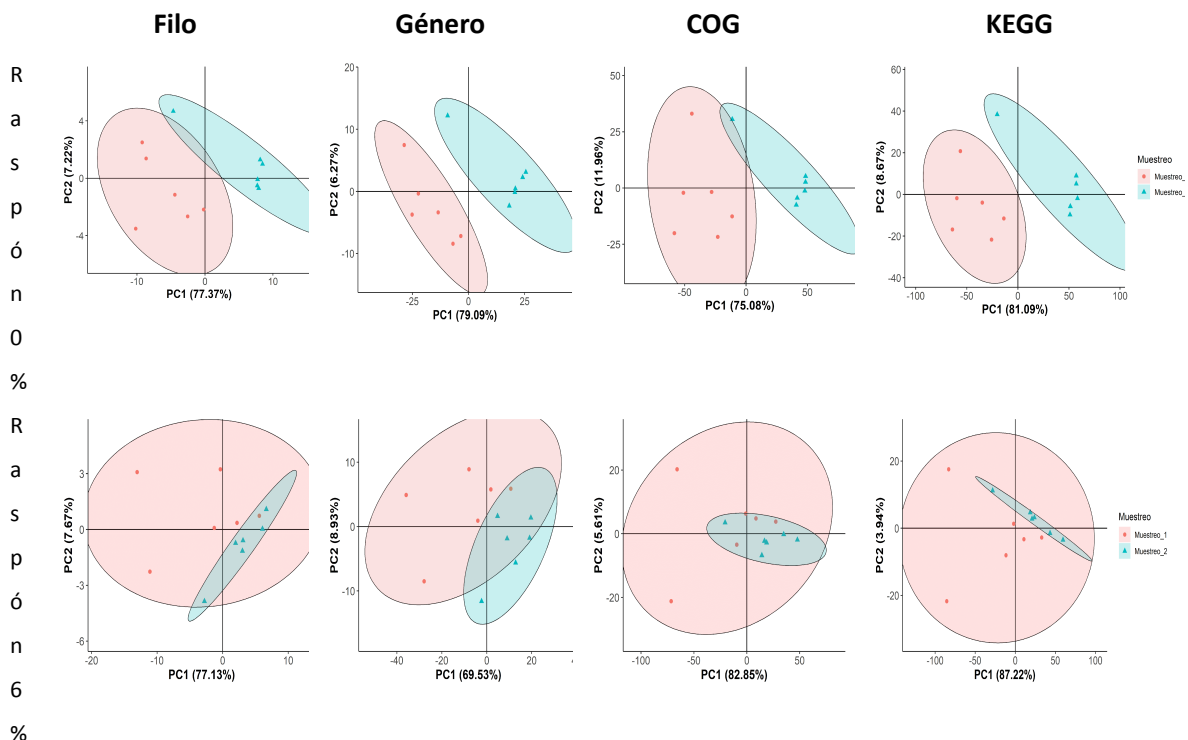
Figura 5. Beta-diversidad de los diferentes niveles taxonómicos a nivel de filo y género, y niveles en términos COG y rutas KEGG según la inclusión de raspón en el muestreo 1.



La mayor beta-diversidad debida a la inclusión de raspón en el muestreo 1 concuerdan con los resultados de Biscarini et al. (2018) en terneros lecheros alimentados con dietas suplementadas con orujo de uva y con los de Vasta et al. (2019) en sistemas in vitro (RUSITEC). La ausencia de efecto en el muestreo 2 puede ser otra prueba de la adaptación de la comunidad microbiana ruminal de los terneros raspón 6% que ha sido comentada con anterioridad ya que la beta-diversidad microbiana fue similar en terneros alimentados con dietas con 0, 10 y 20% de orujo de uva seco durante 4 meses (Li et al., 2024).

En los terneros raspón 0%, los análisis mostraron diferencias para los taxones a nivel de filo, género, COG y KEGG ($p = 0,004, 0,007, 0,003$ y $0,005$, respectivamente). En los terneros raspón 6%, sólo se encontraron diferencias entre muestreos para el nivel taxonómico género ($p = 0,02$), mientras que para los términos COG ($p = 0,08$) y KEGG ($p = 0,08$) se encontraron tendencias (Figura 6).

Figura 6. Beta-diversidad de los diferentes niveles taxonómicos a nivel de filo y género, y niveles en términos COG y rutas KEGG, en terneros raspón 0% y 6%.



5.4. Análisis de agrupamiento jerárquico

En las figuras 7, 8 y 9 se estudia la similitud entre las muestras mediante dendrogramas, mientras que la abundancia de taxones a nivel de filo, agrupados según la inclusión de raspón o muestra, se visualizan en mapas de calor. Los *clusters* indican la pertenencia de las muestras según el número óptimo predicho. Las abundancias más altas se muestran en tonos rojos oscuros y las más bajas en tonos azules.

En la inclusión de raspón no se encontró un agrupamiento claro ni en el muestreo 1 (escenario 1) ni en el 2 (escenario 2). Como ejemplo, se muestran los resultados para filo (Figura 7). En el estudio del efecto del muestreo para los terneros raspón 0% (escenario 3) y raspón 6% (escenario 4), los terneros mostraron cierto agrupamiento dependiendo de los *cluster* predichos, especialmente para los COG y KEGG (Figuras 8 y 9), indicando que el muestreo tiene un gran efecto en los datos analizados.

Figura 7. Análisis jerárquico a nivel de filo (algoritmo de Ward y la distancia euclidiana) en los dos muestreos.

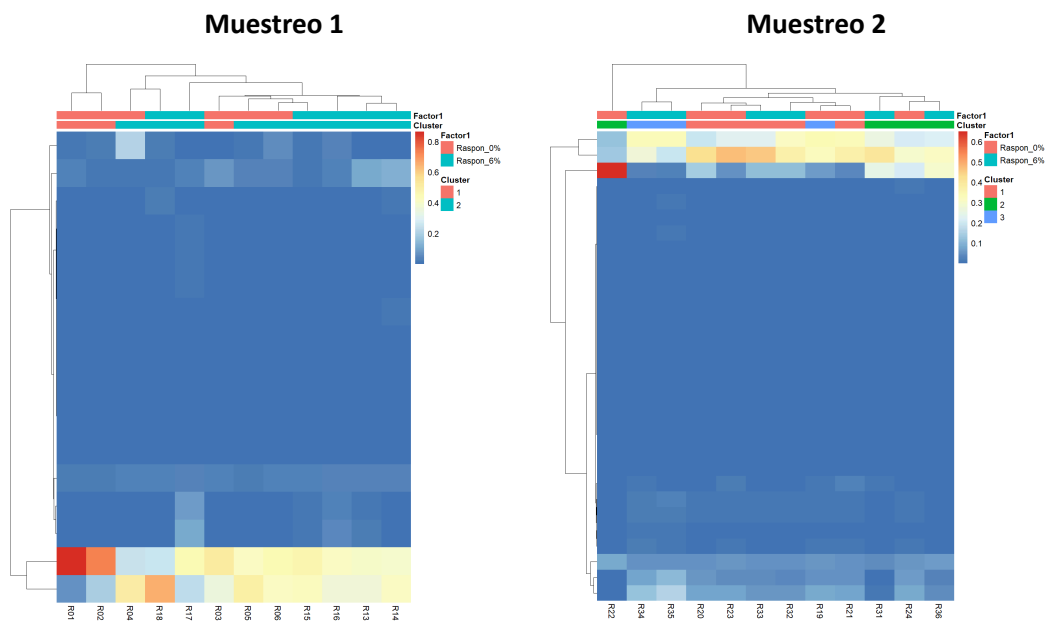


Figura 8. Análisis jerárquico (algoritmo de Ward y la distancia euclidiana) en los terneros raspón 0%

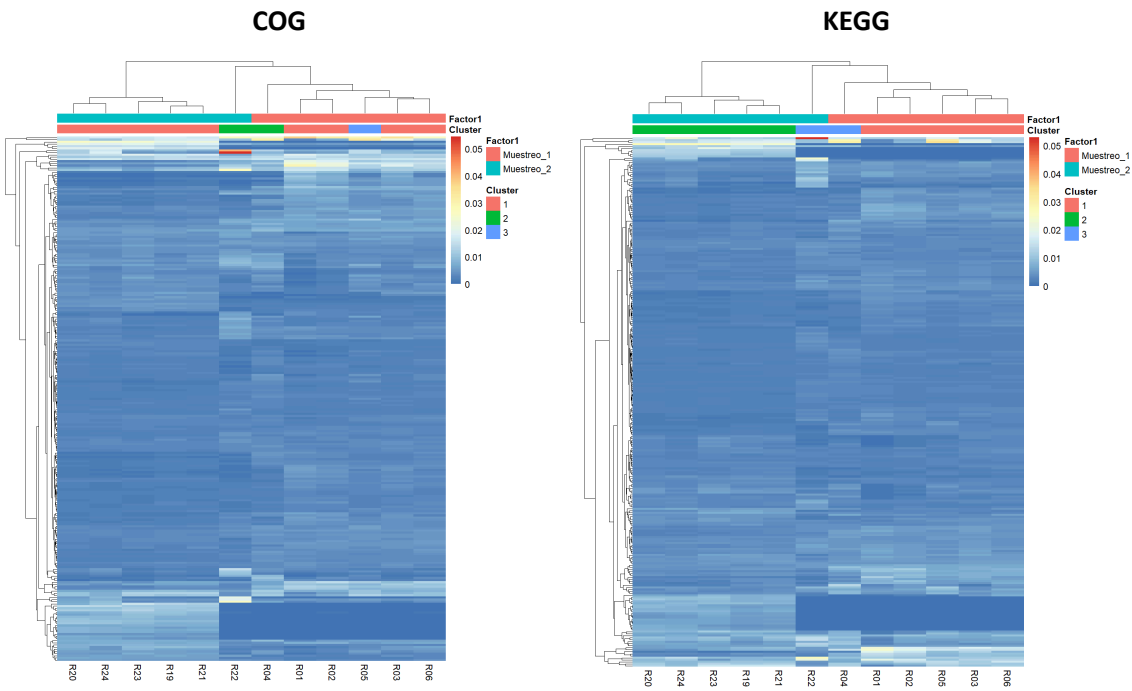
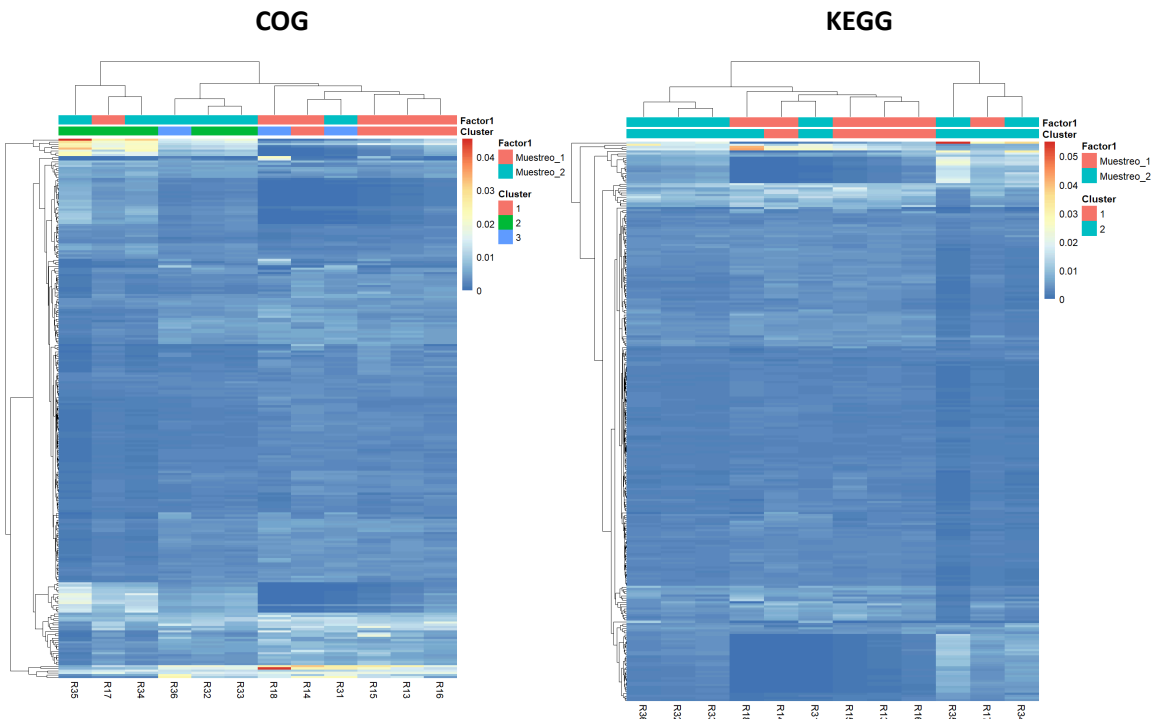


Figura 9. Análisis jerárquico (algoritmo de Ward y la distancia euclidiana) en los terneros raspón 6%.



5.5. Análisis de abundancia diferencial

Se realizó un estudio de abundancia diferencial de los diferentes niveles analizados en este estudio, agrupados por la inclusión de raspón o el muestreo, con DESEQ2. En las Tablas suplementarias 3, 4, 5, 6 y 7 se pueden ver los diagramas MA, que representan la relación entre la media de la expresión y el log-ratio, para los escenarios que se encontraron significaciones.

En el efecto del raspón en el muestreo 1 no se encontraron taxones significativos a nivel de filo, aunque 17 mostraron una tendencia (p (FDR) < 0,10; datos no presentados). A nivel de género se encontraron 51 taxones significativos (Tabla suplementaria 3), mientras que 48 y 147 niveles lo fueron a nivel de COG y KEGG para un $|FC| \geq 2$ ($|\log_2FC| \geq 1$) (datos no mostrados). La inclusión de raspón se asoció con una sobrerrepresentación de hongos anaerobios del género *Neocallimastigomycota* (*Neocallimastix*, *Piromyces*, *Anaeromyces*), protozoos ciliados (*Entodinium*, *Paramecium*, *Tetrahymena*, entre otros) y bacterias fibrotróficas (*Fibrobacterales*, *Quinella*, *Treponema*), lo que sugiere una microbiota con taxones especializados en la degradación de fibra y en la diversificación de rutas fermentativas. Estos grupos han sido descritos como actores clave en la hidrólisis de polisacáridos estructurales y en la liberación de azúcares fermentables, de modo que su incremento puede contribuir a mejorar la utilización de la fibra de la dieta.

Por el contrario, se observó una bajorepresentación de bacterias productoras de butirato como *Roseburia* y *Anaerostipes*, así como de *Hungatella* y *Anaerovibrio*, lo cual es coherente con la sensibilidad de muchas bacterias Gram positivas al efecto antimicrobiano de los polifenoles, descrita previamente en estudios in vitro e in vivo (Bhatta et al., 2009; Patra y Saxena, 2011). Este patrón sugiere que los polifenoles no sólo modulan la abundancia relativa de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta, sino que también favorecen a eucariotas ruminales (protozoos y hongos) fermentadores de fibra. En el muestreo 2 (escenario 2) no aparecieron taxones, ni COG y KEGG significativos (datos no presentados).

En los animales del raspón 0%, en el análisis de abundancia diferencial entre los 2 muestreos (escenario 3) se encontraron 16, 43, 689 y 866 niveles significativos ($|FC| \geq 2$; $|\log_2FC| \geq 1$) a nivel de filo, género (Tablas suplementarias 4 y 5 respectivamente), COG y KEGG (datos no mostrados), respectivamente. A nivel de filo, en los animales mayores se observó un aumento de *Fibrobacterota* y *Spirochaetota*, relacionados con la digestión de fibra, así como de *Bacillota* y *Bacteroidota*, principales responsables de la fermentación ruminal. También aparecieron más abundantes filos secundarios (*Actinomycetota*, *Melainabacteria*, *Cyanobacteriota*) que reflejan una mayor diversidad. Además, el incremento de *Uroviricota* y otros virus sugiere un viroma más activo. Estos resultados coinciden con lo descrito en la bibliografía, donde el microbioma ruminal evoluciona hacia comunidades más estables, diversas y eficientes conforme avanza la edad del animal (Yáñez-Ruiz et

al., 2015). Los resultados a nivel de género corroboraron estos hallazgos. En los terneros del raspón 6% para este mismo análisis (escenario 4), aparecieron 10 y 38 taxones significativos a nivel de filo, y género respectivamente, con un $|FC| \geq 2$ ($|\log_2 FC| \geq 1$) (Tablas suplementarias 6 y 7), mientras que 77 y 71 niveles lo fueron para COG y KEGG, respectivamente. A nivel de filo, en los animales mayores se redujeron filios mayoritariamente eucariotas y ambientales (*Ciliophora*, *Apicomplexa*, *Rotifera*, *Chytridiomycota*), mientras que aumentaron filios propios del rumen maduro como *Euryarchaeota* (metanógenos), *Spirochaetota* (fibrotróficos) y *Candidatus Melainabacteria*. Este cambio refleja la transición hacia una microbiota más especializada y estable, en línea con lo descrito en la bibliografía sobre la maduración del ecosistema ruminal (Yáñez-Ruiz et al., 2015).

En el análisis de enriquecimiento funcional, el metagenoma ruminal del grupo raspón 6% en el muestreo 1 mostró un patrón consistente entre KEGG y COG en términos de sobrerrepresentación (FDR < 0,05) de funciones de señalización y control metabólico. En KEGG se enriquecieron “Procesamiento de información ambiental” y “Sistemas del organismo”, destacando “Transducción de señales” y “Transporte y catabolismo”; a nivel de vías fueron significativas “Señalización Ras”, “Señalización AMPK” y “Fosfatasas de proteínas y proteínas asociadas”, indicando una comunidad más regulada y adaptable a la disponibilidad de sustratos. En COG se enriquecieron “Predicción de función general (R)” y “Modificación postraduccional, recambio proteico y chaperonas (O)”, junto con “Ligasa de ubiquitina-proteína”, lo que apunta a mayor homeostasis proteica, reciclaje y control regulatorio; todo ello es coherente con una respuesta rápida al estrés y con la diversidad alfa observada. En cuanto a bajo-representación, no se detectaron categorías significativas tras corrección por FDR.

En cuanto al escenario 3, el análisis de enriquecimiento de términos de sobrerrepresentación KEGG y COG presenta un patrón significativo (p (FDR) < 0,05) que apunta a una comunidad más regulada y adaptable: se enriquecen la “transducción de señales”, el “transporte de membrana (ABC)”, la “motilidad/ensamblaje flagelar”, el “crecimiento celular”, junto con “transporte/uso de carbohidratos”, “replicación/recuperación del ADN” y “producción de energía” en el muestreo 2 con respecto al 1. Este perfil es coherente con ajustes rápidos ante cambios de sustratos y con una mayor actividad biosintética/energética en los taxones dominantes del rumen.

Con relación a los términos bajo-representados en el muestreo 2, los términos KEGG muestran enriquecimiento en “metabolismo energético”, “metabolismo aminoacídico” y “factores de transcripción”, sugiriendo reconfiguraciones funcionales (menor peso de módulos metabólicos centrales y cambios en regulación/transcripción). En COG sólo se encontraron tendencias nominales (p < 0,05 sin ajuste FDR) en “reparación/replicación” y “biogénesis de pared”. Finalmente, con respecto al escenario 4, en KEGG, sólo se enriquecieron en los términos sobrerrepresentados “procesos de información genética y procesos celulares/señalización”. En el análisis COG, los términos sobrerrepresentados mostraron un enriquecimiento significativo en “replicación, recombinación y

reparación del ADN”, indicando mayor peso de módulos de mantenimiento genómico. No se detectaron enriquecimientos en los términos COGs bajo representados. En conjunto, el perfil sugiere una comunidad con mayor capacidad de mantenimiento del genoma y posibles incrementos (no confirmados tras FDR) en energía, metabolitos secundarios y remodelación de la envoltura celular.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La inclusión de raspón en la dieta de terneros puede ser recomendable especialmente en las primeras fases de la finalización en cuanto al incremento de la alfa- como la beta-diversidad pero habría que evaluar su efecto sobre los rendimientos y la emisión de metano y confirmar los resultados con un mayor número de animales.
- La inclusión de raspón en la dieta evidenció un efecto selectivo de este subproducto sobre el ecosistema ruminal en el primer muestreo, favoreciendo una microbiota con mayor capacidad de degradación fibrosa y diversificación fermentativa, aunque a costa de una reducción de bacterias productoras de butirato.
- Los terneros de mayor edad mostraron comunidades más estables, diversas y eficientes.

En conjunto, los resultados sugieren que la inclusión de raspón en la dieta puede modular el microbioma ruminal, promoviendo la diversidad y resiliencia en etapas iniciales, favoreciendo la especialización y eficiencia del ecosistema microbiano con el tiempo.

Conclusions

The following conclusions can be drawn based on the results obtained in this study:

- The inclusion of grape stem in finishing young bulls diets may be particularly advisable during the early finishing phases, given its impact on increasing both alpha- and beta-diversity. However, its effect on performance and methane emissions should be evaluated, and the results confirmed with a larger number of animals.
- The inclusion of grape stem in the diet showed a selective effect of this by-product on the ruminal ecosystem at the first sampling, favoring a microbiota with greater fiber-degrading capacity and fermentative diversification, although at the cost of a reduction in butyrate-producing bacteria.
- Older finishing young bulls exhibited more stable, diverse, and efficient communities. Overall, the results suggest that grape stem inclusion in the diet can modulate the ruminal microbiome, promoting diversity and resilience in early stages while fostering specialization and efficiency of the microbial ecosystem over time.

7. VALORACIÓN PERSONAL

Este trabajo se ha desarrollado dentro del **proyecto PID2021-128492OR-I00 financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y por FEDER, UE**. Por ello, me gustaría agradecer a nivel institucional al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón por dejarme realizar el TFG en sus instalaciones; al personal de Bescós de la Garcipollera; del laboratorio de genética molecular, a Marisol; del laboratorio de valoración nutritiva, a Andrés y a Celia; y al personal investigador implicado en el ensayo: Isabel, Marga, Sandra y Daniel (UdL).

Ha sido todo un reto personal, una experiencia formativa muy enriquecedora y gratificante que me ha brindado la oportunidad de adentrarme en el área de la investigación, donde he podido adquirir conocimientos teóricos y prácticos relevantes para mi futura profesión como el manejo de terneros, toma de muestras y su posterior procesado, búsqueda de artículos científicos de calidad y su correcta citación, interpretación de datos y capacidad de síntesis. Por ello, a nivel personal me gustaría agradecer a mis directores de trabajo: Mireia y Jorge por su dedicación, paciencia y ayuda a lo largo de estos meses, y a mí ponente por parte de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza: Jose Luis Olleta, por la cercanía, conocimiento y experiencia en el sector de la producción animal.

No podría acabar este trabajo sin agradecer a mi familia, pareja y amigos por su constante ayuda, confianza y apoyo a lo largo de toda esta etapa universitaria que termina aquí.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abarghuei, M. J., Rouzbehan, Y., & Alipour, D. (2010). The influence of the grape pomace on the ruminal parameters of sheep. *Livestock Science*, *132*(1–3), 73–79.
- Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A.-L., & Haroutounian, S. A. (2012). Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, *48*(2), 316–322.
- Banerjee, S., Schlaeppli, K., & van der Heijden, M. G. A. (2018). Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(9), 567–576.
- Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S., & Williams, D. A. (2017). *The gastrointestinal microbiome: A review*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *1*, 9–25.
- Begley, T. P., Kinsland, C., & Strauss, E. (2001). The biosynthesis of coenzyme A in bacteria. *Vitamins & Hormones*, *61*, 157–171.
- Bergman, E. N. (1990). Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, *70*(2), 567–590.
- Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Enishi, O., & Kurihara, M. (2009). *Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid*

- production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5512–5522.
- Biscarini, F., Palazzo, F., Castellani, F., Masetti, G., Grotta, L., Cichelli, A., & Martino, G. (2018). Rumen microbiome in dairy calves fed copper and grape-pomace dietary supplementations: Composition and predicted functional profile. *PLOS ONE*, 13(11), e0205670.
- Blackford, M., Comby, M., Zeng, L., Dienes-Nagy, Á., Bourdin, G., Lorenzini, F., & Bach, B. (2021). Una revisión sobre la composición de los tallos y su impacto en la calidad del vino. *Molecules*, 26(5), 1240.
- Bleidorn, C. (2016). Third generation sequencing: Technology and its potential impact on evolutionary biodiversity research. *Systematics and Biodiversity*, 14(1), 1–8.
- Branton, D., Deamer, D. W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S. A., Butler, T., Di Ventra, M., Garaj, S., Hibbs, A., Huang, X., Jovanovich, S., Krstic, P. S., Lindsay, S., Ling, X. S., Mastrangelo, C. H., Meller, A., Oliver, J. S., Pershin, Y. V., Ramsey, J. M., ... Akeson, M. (2008). The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1146–1153.
- Caetano, M., Wilkes, M. J., Pitchford, W. S., Lee, S. J., & Hynd, P. I. (2019). Effect of ensiled crimped grape marc on energy intake, performance and gas emissions of beef cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 247, 166–172.
- Calsamiglia, S., Cardozo, P. W., Ferret, A., & Bach, A. (2008). Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *Journal of Animal Science*, 86(3), 702–711.
- Cheng, X., Du, X., Liang, Y., Degen, A. A., Wu, X., Ji, K., Gao, Q., Xin, G., Cong, H., & Yang, G. (2023). Effect of pomace supplement on growth performance, gastrointestinal microbiota, and methane production in Tan lambs. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1264840.
- Chikwanha, O. C., Raffrenato, E., Muchenje, V., Musarurwa, H. T., & Mapiye, C. (2018). Varietal differences in nutrient, amino acid and mineral composition and in vitro rumen digestibility of grape (*Vitis vinifera*) pomace from the Cape Winelands vineyards in South Africa and impact of preservation techniques. *Industrial Crops and Products*, 118, 30–37.
- Costa, M., Alves, S. P., Cappucci, A., Cook, S. R., Duarte, A., Caldeira, R. M., McAllister, T. A., & Bessa, R. J. B. (2018). Effects of condensed and hydrolyzable tannins on rumen metabolism with emphasis on the biohydrogenation of unsaturated fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(14), 3367–3377.
- Costa-Roura S, Villalba D, Balcells J, De la Fuente G. First Steps into Ruminant Microbiota Robustness. *Animals*. 2022; 12(18):2366.
- De Coster, W., D’Hert, S., Schultz, D. T., Cruys, M., & Van Broeckhoven, C. (2018). NanoPack: Visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics*, 34(15), 2666–2669.

- de Vos, W. M., Tilg, H., Van Hul, M., & Cani, P. D. (2022). Gut microbiome and health: Mechanistic insights. *Gut*, *71*(5), 1020–1032.
- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B., Bibillo, A., Bjornson, K., Chaudhuri, B., Christians, F., Cicero, R., Clark, S., Dalal, R., Dewinter, A., Dixon, J., Turner, S. (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*, *323*(5910), 133–138.
- España. (2013, 1 de febrero). *Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia* (BOE núm. 34, de 8 de febrero de 2013, pp. 11370–11421). Boletín Oficial del Estado.
- Esparza, I., Moler, J. A., Arteta, M., Jiménez-Moreno, N., & Ancín-Azpilicueta, C. (2021). Phenolic composition of grape stems from different Spanish varieties and vintages. *Biomolecules*, *11*(8), 1221.
- European Union. (2008, 19 November). Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council on waste and repealing certain Directives. *Official Journal of the European Union*, L 312, 3–30.
- Fernández Mayer, A. (2021). Actualización sobre el uso del orujo de uva en producción animal de carne y leche. *Revista del Foro de la Alimentación, la Nutrición y la Salud*, *3*(1), 25–30.
- Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA). (2020, 2 de marzo). *Orujo de uva*. https://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/orujo-de-uva
- Gao, Y., Fangel, J. U., Willats, W. G. T., Vivier, M. A., & Moore, J. P. (2016). Dissecting the polysaccharide-rich grape cell wall matrix using recombinant pectinases during winemaking. *Carbohydrate Polymers*, *152*, 510–519.
- Gharechahi, J., Vahidi, M. F., Sharifi, G., Ariaeenejad, S., Ding, X., Han, J., & Salekdeh, G. H. (2023). Lignocellulose degradation by rumen bacterial communities: New insights from metagenome analyses. *Environmental Research*, *229*, 115925.
- Goldstein, M., Zhao, L., Li, S., Li, R., Guo, M., Wu, X., Zhang, Y., & Guan, L. L. (2019). Regulation of rumen development in neonatal ruminants through microbial metagenomes and host transcriptomes. *Genome Biology*, *20*(1), 172.
- Greenwood, S. L., Edwards, G. R., & Harrison, R. (2012). Short communication: Supplementing grape marc to cows fed a pasture-based diet as a method to alter nitrogen partitioning and excretion. *Journal of Dairy Science*, *95*(2), 755–758.
- Guil-Guerrero, J. L., Ramos, L., Moreno, C., Zúñiga-Paredes, J. C., Carlosama-Yépez, M., & Ruales, P. (2016). Antimicrobial activity of plant-food by-products: A review focusing on the tropics. *Livestock Science*, *189*, 32–49.

- Hristov, A. N., Ropp, J. K., Grandeem, K. L., Abedi, S., Etter, R. P., Melgar, A., & Foley, A. E. (2005). Effect of carbohydrate source on ammonia utilization in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science*, *83*(2), 408–421.
- Ianni, A., Di Luca, A., Martino, C., Bennato, F., Marone, E., Grotta, L., Cichelli, A., & Martino, G. (2019). Dietary supplementation of dried grape pomace increases the amount of linoleic acid in beef, reduces the lipid oxidation and modifies the volatile profile. *Animals*, *9*(8), 578.
- Immig, I. (1996). The rumen and hindgut as source of ruminant methanogenesis. *Environmental Monitoring and Assessment*, *42*(1–2), 57–72.
- Janssen, P. H., & Kirs, M. (2008). Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(12), 3619–3625.
- Jerónimo, E., Pinheiro, C., Lamy, E., Dentinho, M. T., Sales-Baptista, E., Lopes, O., & Silva, F. C. (2016). Tannins in ruminant nutrition: Impact on animal performance and quality of edible products. En C. A. Combs (Ed.), *Tannins: Biochemistry, food sources and nutritional properties* (pp. 121–168). Nova Science Publishers.
- Johnson, K. A., & Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, *73*(8), 2483–2492.
- Jung, J., Kim, H., Choi, Y., Lee, S., Park, T., Kim, S., & Seo, H. (2019). Host genetics influence the rumen microbiota and heritable rumen microbial features associated with feed efficiency in beef cattle. *Microbiome*, *7*(1), 92.
- Kafantaris, I., Kotsampasi, B., Christodoulou, V., Kokka, E., Kouka, P., Terzopoulou, Z., Gerasopoulos, K., Stagos, D., Mitsagga, C., Giavasis, I., Makri, S., Petrotos, K., & Kouretas, D. (2017). Grape pomace improves antioxidant capacity and faecal microflora of lambs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *101*(5), e108–e121.
- Leahy, S. C., Kelly, W. J., Ronimus, R. S., Wedlock, N., Altermann, E., & Attwood, G. T. (2013). Genome sequencing of rumen bacteria and archaea and its application to methane mitigation strategies. *Animal*, *7*(suppl 2), 235–243.
- Li, L., Cheng, S., Diao, Q., Fu, T., Bi, Y., Wang, A., Li, M., & Tu, Y. (2017). Effects of diets with different NFC/NDF levels on the rumen fermentation parameters and bacterial community in male calves. *Animal Feed Science and Technology*, *225*, 1–10.
- Li, Q. S., Wang, R., Ma, Z. Y., Zhang, X. M., Jiao, J. Z., Zhang, Z. G., Ungerfeld, E. M., Yi, K. L., Zhang, B. Z., Long, L., et al. (2022). Dietary selection of metabolically distinct microorganisms drives hydrogen metabolism in ruminants. *Nature Communications*, *13*, 1234.
- Li, X., Jiao, W., Zhang, W., Xu, Y., Cao, J., & Jiang, W. (2019). Characterizing the interactions of dietary condensed tannins with bile salts. *Food Chemistry*, *276*, 1–7.

- Li, Y., Shi, C., Deng, J., Qiu, X., Zhang, S., Wang, H., Qin, X., He, Y., Cao, B., & Su, H. (2024). Effects of grape pomace on growth performance, nitrogen metabolism, antioxidants, and microbial diversity in Angus bulls. *Antioxidants*, *13*(6), 1010.
- Liu, Z., Wang, K., Nan, X., Cai, M., Yang, L., Xiong, B., & Zhao, Y. (2022). Synergistic effects of 3-nitrooxypropanol with fumarate in the regulation of propionate formation and methanogenesis in dairy cows in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, *88*, e0190821.
- Makkar, H. P. S. (2003). Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, *49*(3), 241–256.
- Martin, K. R., & Appel, C. L. (2009). Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. *Nutrition and Dietary Supplements*, *2*, 1–12.
- Membrive, C. M. B. (2016). Anatomy and physiology of the rumen. En D. D. Millen, M. D. B. Arrigoni & R. D. L. Pacheco (Eds.), *Rumenology* (pp. 1–38). Springer.
- Min, B. R., Barry, T. N., Attwood, G. T., & McNabb, W. C. (2003). *The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: A review*. *Animal Feed Science and Technology*, *106*(1–4), 3–19.
- Mizrahi, I., Wallace, R. J., & Morais, S. (2021). The rumen microbiome: Balancing food security and environmental impacts. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(9), 553–566.
- Mizrahi, I., & Jami, E. (2018). Review: The compositional variation of the rumen microbiome and its effect on host performance and methane emission. *Animal*, *12*(S2), s220–s232.
- Moate, P. J., Williams, S. R. O., Torok, V. A., Hannah, M. C., Ribaux, B. E., Tavendale, M. H., Eckard, R. J., Jacobs, J. L., Auldist, M. J., & Wales, W. J. (2014). Grape marc reduces methane emissions when fed to dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *97*(8), 5073–5087.
- Molina-Alcaide, E., Yáñez-Ruiz, D. R., Moumen, A., Martín-García, A. I., & Martínez, G. (2010). *Effects of feeding winery by-products (grape skins and grape pomace) on nutrient utilization and rumen fermentation in goats*. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *94*(6), e273–e282.
- Moore, K. J., & Jung, H.-J. G. (2001). Lignin and fiber digestion. *Journal of Range Management*, *54*(4), 420–430.
- Morgavi, D. P., Kelly, W. J., Janssen, P. H., & Attwood, G. T. (2013). Rumen microbial (meta)genomics and its application to ruminant production. *Animal*, *7*(Suppl. 1), 184–201.
- Mueller-Harvey, I. (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(13), 2010–2037.
- Nudda, A., Correddu, F., Marzano, A., Battacone, G., Nicolussi, P., Bonelli, P., & Pulina, G. (2015). Effects of diets containing grape seed, linseed, or both on milk production traits, liver and kidney activities, and immunity of lactating dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, *98*(2), 1157–1166.

- OIV (2024). *Estadísticas del sector vitivinícola mundial 2024*. Organización Internacional de la Viña y el Vino. <https://www.oiv.int/>
- Patra, A. K., & Saxena, J. (2011). *Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*, 24–37.
- Patra, A. K., & Saxena, J. (2021). *Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations and methane emissions in ruminants*. *Journal of Applied Microbiology*, *131*(3), 1204–1222.
- Pettersson, E., Lundeberg, J., & Ahmadian, A. (2009). Generations of sequencing technologies. *Genomics*, *93*(2), 105–111.
- Pitta, D. W., Pinchak, W. E., Indugu, N., Vecchiarelli, B., Sinha, R., & Fulford, J. D. (2016). Metagenomic analysis of the rumen microbiome of steers with wheat-induced frothy bloat. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 689.
- Ransom-Jones, E., Jones, D. L., McCarthy, A. J., & McDonald, J. E. (2012). The Fibrobacteres: An important phylum of cellulose-degrading bacteria. *Microbial Ecology*, *63*(2), 267–281.
- Ravachol, J., de Philip, P., Borne, R., Mansuelle, P., Maté, M. J., Perret, S., & Fierobe, H.-P. (2016). Mechanisms involved in xyloglucan catabolism by the cellulosome-producing bacterium *Ruminiclostridium cellulolyticum*. *Scientific Reports*, *6*, 22770.
- Real Decreto 584/2013, de 26 de julio, por el que se regula la gestión de los subproductos del sector vitivinícola*. Boletín Oficial del Estado, núm. 183, de 1 de agosto de 2013, páginas 57038 a 57045.
- Reddy, P. R. K., Elghandour, M. M. M. Y., Salem, A. Z. M., Yaraswini, D., Reddy, P. P. R., Reddy, A. N., & Hyder, I. (2020). Plant secondary metabolites as feed additives in calves for antimicrobial stewardship. *Animal Feed Science and Technology*, *264*, 114469.
- Rodrigues, P. H. M. (2016). Control and manipulation of ruminal fermentation. In D. D. Millen, M. D. B. Arrigoni, & R. D. L. Pacheco (Eds.), *Rumenology* (pp. 95–114). Springer.
- San Martín, D., Ibarruri, J., Luengo, N., Ferrer, J., García-Rodríguez, A., Goiri, I., Atxaerandio, R., Zufía, J., Sáez de Cámara, E., & Iñarra, B. (2023). Evaluation of valorisation strategies to improve grape stems' nutritional value as an ingredient for ruminants' diets. *Sustainability*, *15*(15), 11951.
- Sharma, V., Smolin, J., Nayak, J., Ayala, J. E., Scott, D. A., Peterson, S. N., & Freeze, H. H. (2018). Mannose alters gut microbiome, prevents diet-induced obesity, and improves host metabolism. *Cell Reports*, *24*(12), 3087–3098.
- Slatko, E. J., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). The use of next generation sequencing for improving food safety. *Food Control*, *89*, 1–10.
- Tajima, K., Nonaka, I., Higuchi, K., Tajusari, N., Kurihara, M., Takenaka, A., Mitsumori, M., Kajikawa, H., Aminov, R.I. (2007). Influence of high temperature and humidity on rumen bacterial diversity in Holstein heifers. *Anaerobe*. *13*, 57-64.

- Tamames, J., & Puente-Sánchez, F. (2019). SqueezeMeta, una herramienta automática y portátil para el análisis metagenómico. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 3349.
- Tayengwa, T., Chikwanha, O. C., Dugan, M. E. R., Mutsvangwa, T., & Mapiye, C. (2020). Influence of feeding fruit by-products as alternative dietary fibre sources to wheat bran on beef production and quality of Angus steers. *Meat Science*, *161*, 107969.
- Ungerfeld, E. M. (2015). Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: A meta-analysis. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 37.
- Ungerfeld, E. M. (2020). Metabolic hydrogen flows in rumen fermentation: Principles and possibilities of interventions. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 589.
- Vasta, V., Daghighi, M., Cappucci, A., Buccioni, A., Serra, A., Viti, C., & Mele, M. (2019). Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches. *Journal of Dairy Science*, *102*(5), 3781–3804.
- Vinyard, J. R., Myers, C. A., Murdoch, G. K., Rezamand, P., & Chibisa, G. E. (2021). Optimum grape pomace proportion in feedlot cattle diets: Ruminal fermentation, total tract nutrient digestibility, nitrogen utilization, and blood metabolites. *Journal of Animal Science*, *99*(4), skab044.
- Wang, T., Jiao, J., Wang, H., Degen, A. A., Gou, N., Li, S., Bai, Y., & Shang, Z. (2021). The effects of supplementing sweet sorghum with grapeseeds on dry matter intake, average daily gain, feed digestibility and rumen parameters and microbiota in lambs. *Animal Feed Science and Technology*, *272*, Article 114750.
- Weimer, P. J. (2015, 10 de abril). Redundancia, resiliencia y especificidad del huésped de la microbiota ruminal: implicaciones para ingeniería de fermentaciones ruminales mejoradas. *Frontiers in Microbiology*, *6*, Art. 296.
- Yanza, Y. R., Szumacher-Strabel, M., Jayanegara, A., Kasenta, A. M., Gao, M., Huang, H., Patra, A. K., Warzych, E., & Cieślak, A. (2021). The effects of dietary medium-chain fatty acids on ruminal methanogenesis and fermentation in vitro and in vivo: A meta-analysis. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *105*(3), 874–889.
- Yáñez-Ruiz, D. R., Abecia, L., & Newbold, C. J. (2015). Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: A review. *Frontiers in Microbiology*, *6*, Article 1133.
- Zhang, H., Tong, J., Wang, Z., Xiong, B., & Jiang, L. (2020). Illumina MiSeq sequencing reveals the effects of grape seed procyanidin on rumen archaeal communities in vitro. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *33*(1), 61–68.

ANEXO

Tabla suplementaria 1. Ingredientes de los piensos.

%	0% Raspón	6% Raspón
Maíz	51,8	51,8
Trigo	14,9	14,9
DDGs nacional	8,0	8,0
Paja	6,0	0,0
Raspón	0,0	6,0
Cebada	5,0	5,0
Cascarilla de soja	3,9	6,8
Aceite de palma	2,8	1,6
Tercerillas	2,4	2,1
Soja 44%	1,8	0,0
Carbonato cálcico	1,0	1,0
Melaza de caña	1,0	1,0
Sal de mina	0,4	0,41
Urea	0,3	0,5
Complemento vitamínico -mineral	0,3	0,3
Tampón	0,3	0,3
Bicarbonato sódico	0,3	0,3

Tabla suplementaria 2. Calidad de secuenciación masiva por nanoporos (Q>10).

Raspón	Muestreo	Tras secuenciación		Tras control de calidad con Nanoplot		
		Gb totales	N Seq.(10 ³) ¹	Q ²	Longitud (pb)	Gb totales
0%	1	1,39	1227,1	18,8	1072,6	1,32
0%	1	0,92	490,7	18,5	1785,2	0,88
0%	1	0,92	930,7	18,6	1690,9	0,86
0%	1	0,91	622,6	17,8	1391,3	0,86
0%	1	1,96	1812,91	18,2	1014,5	1,84
0%	1	0,82	433,5	18,2	1805,6	0,78
6%	1	1,62	1694,61	20,1	915,9	1,55
6%	1	0,82	495,12	19,2	1580	0,78
6%	1	1,41	1227,26	19,7	1106,8	1,35
6%	1	1,30	1185,83	20,1	1037,6	1,23
6%	1	2,39	1848,82	20,6	1242,7	2,14
6%	1	2,26	2446,06	19,4	876,1	2,14
0%	2	1,59	2402,47	19,8	607,4	1,46
0%	2	2,99	3124,44	20	920,7	2,88
0%	2	1,67	2617,25	19,8	584,7	1,53
0%	2	1,24	1650,91	17,6	696,3	1,15
0%	2	1,87	3138,93	19,7	536,8	1,68
0%	2	1,73	1720,60	20	959,1	1,65
6%	2	0,46	321,43	18,6	1372,4	0,44
6%	2	1,33	1553,27	19,6	820,6	1,27
6%	2	0,68	924,48	19,6	693,6	0,64
6%	2	1,17	1818,22	20,3	609,9	1,11
6%	2	2,11	3431,7	20,5	583,5	2,01
6%	2	1,12	1491,11	18,9	705,6	1,05

¹número de secuencias; ²calidad media de las secuencias, ³longitud de las secuencias media en pares de bases.

Tabla suplementaria 3. Abundancia diferencial entre los terneros raspón 0% y 6% respectivamente para género (escenario 1).

Género	log2FC ¹	P-valor ²	Género	log2FC ¹	P-valor ²
<i>Pseudocohnilembus</i>	4.9	0.002	<i>Plasmodium</i>	4.4	<0.001
<i>Unclas.³ Spirotrichea</i>	4.9	0.001	<i>Un³.Opitutaes</i>	4.4	0.002
<i>Anaeramoeba</i>	4.8	<0.001	<i>Un³.Eurotatoria</i>	4.4	0.004
<i>Ichthyophthirius</i>	4.8	0.002	<i>Anaeromyces</i>	4.3	0.009
<i>Entodinium</i>	4.7	0.001	<i>Entamoeba</i>	4.2	0.003
<i>Un³.Sporadotrichida</i>	4.7	0.002	<i>Un³.Acholeplasmatales</i>	4.1	<0.001
<i>Piromyces</i>	4.7	0.002	<i>Quinella</i>	3.9	0.002
<i>Un³.Ciliophora</i>	4.7	0.001	<i>Rotaria</i>	3.9	0.001
<i>Paramecium</i>	4.7	<0.001	<i>Un³.Eukaryota</i>	3.9	<0.001
<i>Un³.Fibrobacterales</i>	4.6	0.002	<i>Un³.Elusimicrobiota</i>	3.7	<0.001
<i>Un³.Oligohymenophorea</i>	4.6	0.001	<i>Un³.Arthropoda</i>	3.6	<0.001
<i>Moneuplotes</i>	4.6	0.002	<i>Un³.Magnoliopsida</i>	3.6	<0.001
<i>Histomonas</i>	4.6	0.003	<i>Un³.Ascomycota</i>	3.6	0.002
<i>Un³.Oomycota</i>	4.6	0.01	<i>Un³.Streptophyta</i>	3.2	<0.001
<i>Stylonychia</i>	4.6	0.002	<i>Un³.Paludibacteraceae</i>	3	0.004
<i>Tritrichomonas</i>	4.6	0.002	<i>Un³.Chordata</i>	2.8	0.02
<i>Un³.Neocallimastigaceae</i>	4.5	0.001	<i>Chryseobacterium</i>	2.8	0.001
<i>Blepharisma</i>	4.5	<0.001	<i>Halteria</i>	2.5	0.002
<i>Neocallimastix</i>	4.5	0.001	<i>Un³.Elusimicrobiaceae</i>	2.2	0.02
<i>Un³.Insecta</i>	4.5	<0.001	<i>Treponema</i>	2	0.04
<i>Tetrahymena</i>	4.5	0.002	<i>Hungatella</i>	-2.4	0.006
<i>Un³.Heterotrichida</i>	4.4	0.002	<i>Anaerostipes</i>	-2.5	0.02
<i>Stentor</i>	4.4	0.004	<i>Roseburia</i>	-2.6	0.03
<i>Un³.Rickettsiales</i>	4.4	0.001	<i>Anaerovibrio</i>	-2.7	0.005

¹abundancia relativa superior a 2 entre las condiciones comparadas ²ajustado ³Unclassified

Tabla suplementaria 4. Abundancia diferencial entre muestreos para filo en terneros raspón 0% (escenario 3).

Filo	log2FC ¹	P-valor ²
Thermodesulfobacteriota	3.58	<0.001
Candidatus Melainabacteria	2.86	0.003
Cyanobacteriota	2.61	0.004
Spirochaetota	2.23	0.01
Rotifera	-2.35	<0.001
Evosea	-2.45	0.001
Apicomplexa	-2.67	<0.001
Ciliophora	-2.70	0.001
Mollusca	-2.92	<0.001
Parabasalia	-2.93	<0.001

¹abundancia relativa superior a 2 entre las condiciones comparadas ²ajustado

Tabla suplementaria 5. Abundancia diferencial entre muestreos para género en terneros raspón 0% (escenario 3).

Género	log ₂ FC ¹	P-valor ²
<i>Roseburia</i>	8.28	<0.001
<i>Intestinibaculum</i>	8.05	<0.001
<i>Anaerostipes</i>	6.94	<0.001
<i>Hallella</i>	4.45	<0.001
<i>Absicoccus</i>	3.79	0.01
<i>Sodaliphilus</i>	3.72	<0.001
<i>Succinatimonas</i>	3.65	<0.001
<i>Lachnospira</i>	3.19	<0.001
<i>Olsenella</i>	3.02	0.002
<i>Sharpea</i>	2.92	0.01
<i>Unclassified Erysipelotrichales</i>	2.67	0.03
<i>Unclassified Coriobacteriaceae</i>	2.62	0.004
<i>Unclassified Prevotellaceae</i>	2.50	0.004
<i>Unclassified Actinomycetota</i>	2.47	0.002
<i>Clostridium</i>	2.46	<0.001
<i>Oribacterium</i>	2.11	0.001
<i>Unclassified Coriobacteriales</i>	2.03	0.02
<i>Streptococcus</i>	2.00	<0.001
<i>Methanosphaera</i>	-2.25	<0.001
<i>Unclassified Chordata</i>	-3.16	<0.001
<i>Unclassified Streptophyta</i>	-3.69	<0.001

¹abundancia relativa superior a 2 entre las condiciones comparadas ²ajustado

Tabla suplementaria 6. Abundancia diferencial entre muestreos para filo en terneros raspón 6% (escenario 4).

Filo	log ₂ FC ¹	P-valor ²
<i>Unclassified Viruses</i>	4.99	<0.001
<i>Spirochaetota</i>	4.56	<0.001
<i>Uroviricota</i>	3.62	0.004
<i>Actinomycetota</i>	3.37	0.004
<i>Candidatus Melainabacteria</i>	3.31	0.002
<i>Bacteroidota</i>	2.66	0.026
<i>Cyanobacteriota</i>	2.63	0.002
<i>Bacillota</i>	2.49	0.007

¹abundancia relativa superior a 2 entre las condiciones comparadas ²ajustado

Tabla suplementaria 7. Abundancia diferencial entre muestreos para género en terneros raspón 6% (escenario 4).

Género	log2FC ¹	P-valor ²		log2FC ¹	P-valor ²
<i>Lactimicrobium</i>	7.08	<0.001	Un.3 Spirochaetota	3.20	0.012
<i>Un.3 Bifidobacteriaceae</i>	6.28	<0.001	Clostridium	3.15	<0.001
<i>Brachyspira</i>	6.10	<0.001	Sodaliphilus	3.14	0.006
<i>Hallella</i>	5.29	0.003	Un.3 Mollicutes	3.09	0.002
<i>Bifidobacterium</i>	4.98	<0.001	Un.3 Erysipelotrichales	2.86	0.029
<i>Un.3 Anaeroplasmataceae</i>	4.98	<0.001	Un.3 Spirochaetales	2.55	0.03
<i>Megasphaera</i>	4.90	<0.001	Un.3 Veillonellaceae	2.51	0.048
<i>Roseburia</i>	4.83	0.002	Un.3 Coriobacteriales	2.44	0.03
<i>Phascolarctobacterium</i>	4.74	<0.001	Sharpea	2.39	0.048
<i>Absicoccus</i>	4.48	<0.001	Dorea	2.25	0.01
<i>Lachnospira</i>	4.35	<0.001	Un.3 Caudoviricetes	2.17	0.048
<i>Anaerostipes</i>	4.20	<0.001	Un.3 Lachnospiraceae	2.00	0.01
<i>Un.3 Clostridiaceae</i>	3.50	<0.001	Schwartzia	-2.21	0.01
<i>Acidaminococcus</i>	3.40	0.004	Un.3 Thermoguttaceae	-2.52	0.02
<i>Olsenella</i>	3.38	0.002	Helicobacter	-3.03	<0.001
<i>Un.3 Viruses</i>	3.25	0.002	Anaerovibrio	-3.09	0.004
<i>Succinatimonas</i>	3.24	0.02	Un.3 Pseudomonadota	-6.49	<0.001
<i>Un.3 Prevotellaceae</i>	3.22	0.006			

¹abundancia relativa superior a 2 entre las condiciones comparadas ²ajustado ³Unclassified

Figura suplementaria 1. Alfa-diversidad en términos COG y rutas KEGG, según la inclusión de raspón en el muestreo 1. * indica diferencias entre los grupos (p<0,05). NS indica (p>0,05).

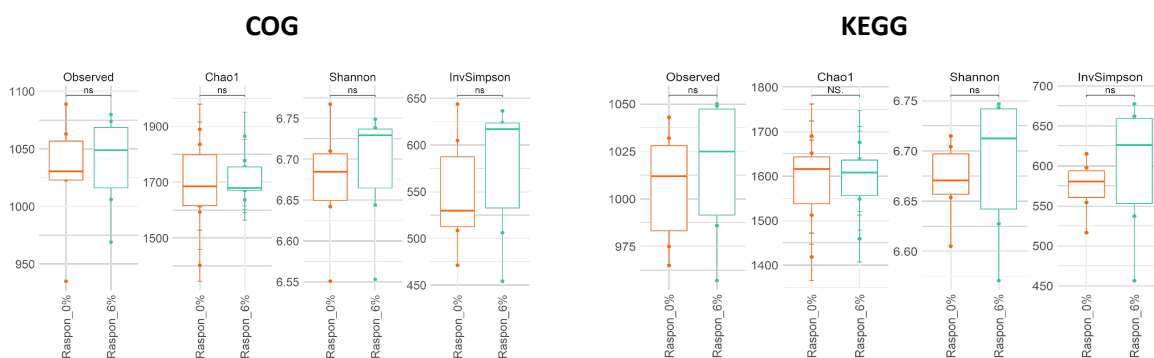


Figura suplementaria 2. Alfa-diversidad de los diferentes niveles taxonómicos a nivel de filo y género, y niveles en términos COG y rutas KEGG, según la inclusión de raspón en el muestreo 2. * indica diferencias entre los grupos ($p < 0,05$). NS indica ($p > 0,05$).

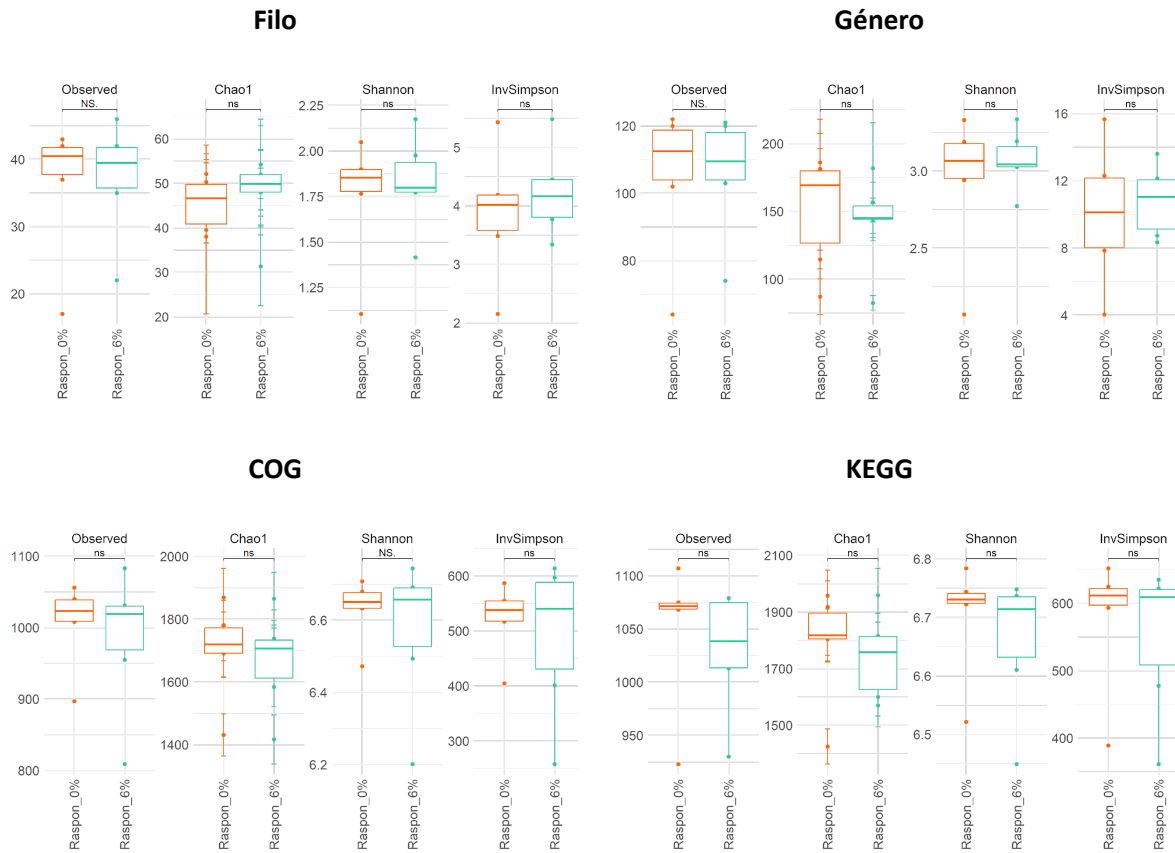
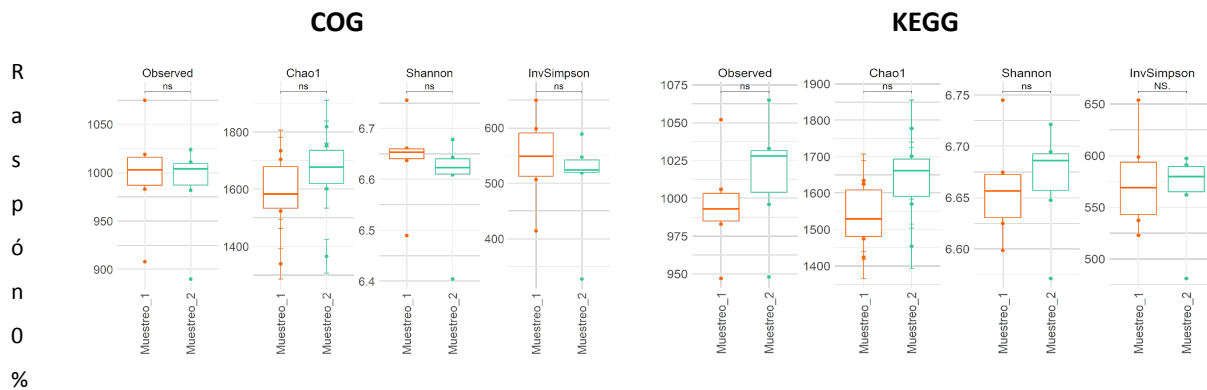


Figura suplementaria 3. Alfa-diversidad en términos COG y rutas KEGG en los terneros raspón 0% y 6%. * indica diferencias entre los grupos ($p < 0,05$). NS indica ($p > 0,5$).



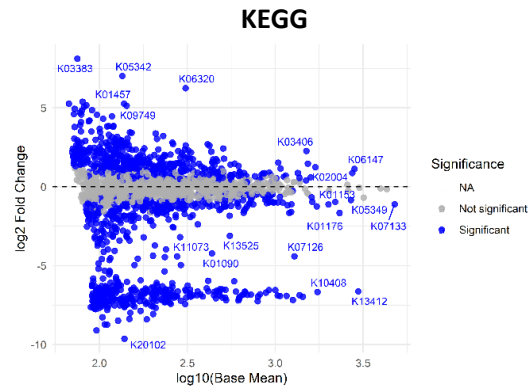
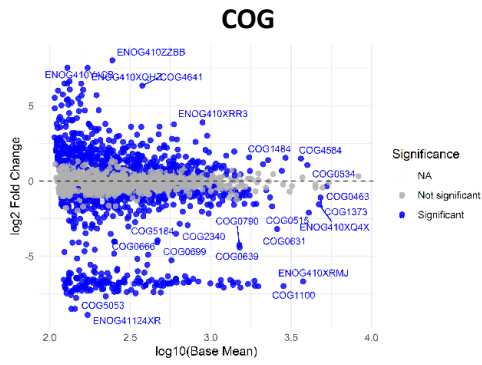


Figura suplementaria 6. Diagrama MA a nivel de filo, género, COG y KEGG para los terneros raspón 6% entre los muestreos 1 y 2. En azul se muestran los términos significativos p (FDR) < 0,05.

