**universidad
de león**

Efectos del pH ruminal y de la composición de la dieta sobre la hidrogenación de los ácidos grasos y la fermentación en el rumen

Effects of ruminal pH and diet composition on fatty acid hydrogenation and microbial fermentation in the rumen

Julio Ernesto Vargas Sánchez

Tesis doctoral, Universidad de León, España

PhD thesis, University of León, Spain

2018

**universidad
de león**

Efectos del pH ruminal y de la composición de la dieta sobre la hidrogenación de los ácidos grasos y la fermentación en el rumen

Julio Ernesto Vargas Sánchez

**Tesis para optar a la obtención del
título de Doctor por la Universidad de León
(Programa de Doctorado en
Ciencias Veterinarias y de los Alimentos)
con la mención “Doctorado internacional”**

Directores:

**Secundino López Puente
Sonia Andrés Llorente**

León, 2018

Agradecimientos

Deseo expresar mis agradecimientos a la Universidad de Caldas por facilitarme las condiciones para adelantar los estudios de doctorado. A los directores de la tesis: Secundino López Puente y Sonia Andrés Llorente por brindarme su experimentada orientación y su permanente disposición para el encuentro y la conversación. A los profesores de la Universidad de León por su amplio compartir de conocimientos y vivencias. A la Universidad de León, particularmente al Departamento de Producción Animal y al ICTAL al igual que al Instituto de Ganadería de Montaña (Universidad de León-CSIC) por poner a disposición de la investigación sus laboratorios y su personal, quien generosamente también me ha compartido su conocimiento y me ha prestado el concurso de sus capacidades.

Este trabajo de investigación fue financiado por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (proyecto LE007A07).

*A la memoria de Don Quijote,
develó los gigantes tras nuestros molinos de viento*

*A Beatriz,
compañía del vivir y compañera de las ideas*

*A Eloisa y Samuel,
la vida hecha afecto que crece ante mis ojos*

A mis padres: Hilda y Ernesto,

TABLA DE CONTENIDO

	RESUMEN	1
1.	INTRODUCCIÓN, PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA Y OBJETIVOS	7
1.1	BIBLIOGRAFIA	13
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	EL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO	17
2.1.1	Formación del ácido linoleico conjugado (C18:2 c9t11) en el rumen	18
2.1.1.1	La digestión microbiana en el rumen	18
2.1.1.2	Digestión ruminal de carbohidratos, proteínas y lípidos	19
2.1.1.3	Formación de C18:2 c9t11 como consecuencia de la hidrogenación ruminal de ácidos grasos	22
2.1.2	Síntesis endógena de C18:2 c9t11 en la glándula mamaria	23
2.1.3	Factores determinantes de la producción del C18:2 c9t11	24
2.1.3.1	Factores no nutricionales	25
2.1.3.2	Factores relacionados con la dieta	26
2.2	FACTORES NUTRICIONALES RELACIONADOS CON LOS LÍPIDOS DEL ALIMENTO	26
2.2.1	Consumo de lípidos y grado de insaturación de los AG	26
2.2.2	Fuentes de suplementación lipídica	26
2.2.2.1	Aceites vegetales	26
2.2.2.2	Aceites de origen marino: extraídos de pescado o de Algas	29
2.2.3	Nivel de incorporación de grasas y aceites	31
2.2.4	Efecto de la forma de presentación de los lípidos	32
2.2.5	Efectos concurrentes de la adición de lípidos a la dieta	32
2.2.5.1	Aumento de la concentración energética del pienso y consumo de alimento	33
2.2.5.2	Reducción de la digestibilidad	33
2.2.5.3	Acción de los lípidos sobre los microorganismos	34
2.2.5.4	Reducción en la producción de metano	35
2.2.5.4.1	Uso de grasas para reducir la formación de metano en el rumen	35
2.2.5.4.2	Otras estrategias nutricionales para reducir la formación de metano en el rumen	37
2.3	FACTORES NUTRICIONALES RELACIONADOS CON LA FERMENTACIÓN RUMINAL	38
2.3.1	Efecto del consumo de alimentos concentrados y del pH ruminal sobre el metabolismo de los lípidos en el rumen	39
2.3.1.1	Composición de la dieta (relación forraje:concentrado) y metabolismo lipídico en el rumen	39

2.3.1.2	Ingestión de alimentos concentrados y efectos sobre el pH ruminal	44
2.3.1.3	pH y metabolismo lipídico en el rumen	46
2.3.2	Efecto del consumo de alimentos concentrados y del pH ruminal sobre la población microbiana del rumen	48
2.3.3	Efecto del consumo de alimentos concentrados y del pH ruminal sobre la digestión del alimento	49
2.3.4	Efecto del consumo de alimentos concentrados y del pH ruminal sobre la producción de metano	50
2.4	BIBLIOGRAFÍA	52
3	MATERIALES Y MÉTODOS	69
3.1	FERMENTACIÓN <i>IN VITRO</i>	69
3.1.1	Técnica de la digestibilidad <i>in vitro</i>	69
3.1.1.1	Aparato y método	69
3.1.1.2	Estudios de digestibilidad <i>in vitro</i>	70
3.1.1.3	Medio de cultivo control	71
3.1.2	Sistema de fermentadores de flujo semicontinuo (Rusitec)	72
3.1.2.1	Descripción del aparato	72
3.1.2.2	Manejo del sistema	73
3.1.2.2.1	Inóculo, inoculación y fase de adaptación	74
3.1.2.2.2	Rutina diaria de trabajo	75
3.1.2.2.3	Periodo de mediciones y toma de muestras	76
3.1.2.2.3.1	pH	76
3.1.2.2.3.2	Desaparición de sustrato incubado	77
3.1.2.2.3.3	Productos finales de la fermentación en el efluente	77
3.1.2.2.3.4	Producción de gas de fermentación	77
3.1.2.2.3.5	Síntesis de proteína microbiana	77
3.1.2.2.3.6	Perfil lipídico: ácidos grasos de cadena larga	79
3.1.3	Actividad fermentativa	79
3.2	PROCESADO DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS QUÍMICOS	80
3.2.1	Metano	80
3.2.2	Amoníaco	80
3.2.3	Ácidos grasos volátiles	81
3.2.4	Lactato	82
3.2.5	Análisis de la composición química	82
3.2.6	Síntesis de proteína microbiana	83
3.2.6.1	Análisis del enriquecimiento en ¹⁵ N	83
3.2.7	Análisis de ácidos grasos de cadena larga (AGCL)	84
3.2.7.1	Extracción	84
3.2.7.2	Derivatización	85
3.2.7.3	Cromatografía de gases	86
3.2.7.4	Biohidrogenación	87
3.2.7.5	Biohidrogenación total	87
3.3	BIBLIOGRAFÍA	89

4	PRUEBAS EXPERIMENTALES	91
4.1	DIGESTIBILIDAD RUMINAL IN VITRO DE FORRAJES BAJO CONDICIONES SUB-ÓPTIMAS DE pH EN LOS INÓCULOS MICROBIANOS Y EN LOS MEDIOS DE CULTIVO	92
4.1.1	Introducción	92
4.1.2	Materiales y métodos	93
4.1.2.1	Inóculos	94
4.1.2.2	Tratamientos y diseño experimental	95
4.1.2.2.1	Estudio #1. Efecto de la adición de heno de gramínea o harina de cebada sobre la digestibilidad de varios forrajes	95
4.1.2.2.2	Estudio #2. Efecto de la solución amortiguadora sobre la digestibilidad de varios forrajes	96
4.1.2.2.3	Estudio #3. Efecto del inóculo y de la adición de heno de gramínea o harina de cebada sobre la digestibilidad de varios forrajes	97
4.1.2.2.4	Estudio #4. Efecto del inóculo y de la solución amortiguadora sobre la digestibilidad de varios forrajes	98
4.1.2.3	Incubación y determinación de la digestibilidad <i>in vitro</i>	98
4.1.3	Resultados	101
4.1.4	Discusión	106
4.1.5	Conclusiones	110
4.1.6	Bibliografía	111
4.2	EFFECTO DE LA RELACIÓN FORRAJE/CONCENTRADO EN LA RACIÓN Y DEL pH DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL PATRÓN DE FERMENTACIÓN, LA PRODUCCIÓN DE METANO Y LA BIOHIDROGENACIÓN RUMINAL	114
4.2.1	Introducción	114
4.2.2	Materiales y métodos	115
4.2.2.1	Tratamientos experimentales	115
4.2.2.2	Recogida y análisis de las muestras	117
4.2.2.3	Análisis de la composición química	117
4.2.2.4	Análisis estadístico	118
4.2.3	Resultados	119
4.2.3.1	Fermentación ruminal	119
4.2.3.1.1	Efecto del tipo de pienso	119
4.2.3.1.2	Efecto del pH	120
4.2.3.2	Perfil de ácidos grasos de cadena larga en la digesta ruminal	123
4.2.4	Discusión	124
4.2.4.1	Digestión del sustrato, patrón de fermentación y síntesis de proteína microbiana en el rumen	124
4.2.4.1.1	Efecto del tipo de pienso	124
4.2.4.1.2	Efecto del pH	129

4.2.4.2	Perfil de ácidos grasos de cadena larga	132
4.2.4.2.1	Efecto del tipo de pienso	132
4.2.4.2.2	Efecto del pH	136
4.2.5	Conclusiones	139
4.2.6	Bibliografía	140
4.3	EFFECTO DE LA ADICION DE ACEITES DE OLIVA, GIRASOL O LINAZA A LA RACIÓN SOBRE EL PATRÓN DE FERMENTACIÓN, LA PRODUCCIÓN DE METANO Y LA BIOHIDROGENACIÓN RUMINAL	145
4.3.1	Introducción	145
4.3.2	Materiales y métodos	146
4.3.2.1	Tratamientos experimentales	146
4.3.2.2	Recogida y análisis de muestras	147
4.3.2.3	Evaluación de los efectos sobre la actividad fermentativa	148
4.3.2.4	Análisis de la composición química	149
4.3.2.5	Análisis estadístico	149
4.3.3	Resultados	151
4.3.4	Discusión	156
4.3.4.1	Digestión del sustrato, patrón de fermentación y síntesis microbiana en el rumen	156
4.3.4.2	Producción de gas de fermentación y metano	160
4.3.4.3	Perfil y biohidrogenación de los ácidos grasos de cadena larga	161
4.3.5	Conclusiones	165
4.3.6	Bibliografía	166
4.4	EFFECTO DE LA ADICION DE ACEITES DE GIRASOL, PESCADO O ALGAS AL PIENSO SOBRE EL PATRÓN DE FERMENTACIÓN, LA PRODUCCIÓN DE METANO Y LA BIOHIDROGENACIÓN RUMINAL	171
4.4.1	Introducción	171
4.4.2	Materiales y métodos	172
4.4.2.1	Tratamientos experimentales	172
4.4.2.2	Recogida y análisis de muestras	174
4.4.2.3	Evaluación de los efectos sobre la actividad fermentativa	174
4.4.2.4	Análisis de composición química	175
4.4.2.5	Análisis estadístico	175
4.4.3	Resultados	177
4.4.4	Discusión	183
4.4.4.1	Digestión del sustrato, patrón de fermentación y síntesis microbiana en el rumen	183
4.4.4.2	Producción de gas de fermentación y metano	187
4.4.4.3	Perfil y biohidrogenación de los ácidos grasos de cadena larga	188
4.4.5	Conclusiones	192
4.4.6	Bibliografía	193

5	DISCUSIÓN GENERAL	200
5.1	MÉTODOS <i>IN VITRO</i> PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL	200
5.2	LA DIGESTIBILIDAD RUMINAL DEL ALIMENTO	204
5.2.1	Efecto del pH y del porcentaje de concentrado en el pienso	205
5.2.2	Efecto de la suplementación lipídica	208
5.3	EL PATRÓN DE FERMENTACIÓN RUMINAL	210
5.3.1	Efecto del pH y del porcentaje de concentrado en el pienso	211
5.3.2	Efecto de la suplementación lipídica	214
5.4	EL PERFIL Y LA HIDROGENACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE CADENA LARGA EN EL RUMEN	216
5.4.1	Efecto del pH y del porcentaje de concentrado en el pienso	217
5.4.2	Efecto de la suplementación lipídica	220
5.5	BIBLIOGRAFÍA	224
6	CONCLUSIONES	230
	SUMMARY	233
	CONCLUSIONS	238
	ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Efecto de la adición de cebada o de heno al medio de cultivo sobre el pH y la digestibilidad in vitro de varios forrajes (estudio #1).	101
Tabla 2.	Efecto de la adición de distintas disoluciones amortiguadoras de McIlvaine al medio de cultivo sobre el pH y la digestibilidad in vitro de varios forrajes (estudio #2)	102
Tabla 3.	pH del medio de cultivo con las distintas fuentes del inóculo y con la adición de sustrato (heno de gramínea o cebada) al medio (estudio #3)	102
Tabla 4.	Efecto de la adición de cebada o de heno al medio de cultivo sobre el pH y la digestibilidad in vitro de varios forrajes (estudio #3).	104
Tabla 5.	pH del medio de cultivo con las distintas fuentes de inóculo y las diferentes disoluciones amortiguadoras (estudio #4)	105
Tabla 6.	Efecto de la fuente de inóculo y de la solución amortiguadora sobre la digestibilidad de la materia seca	105
Tabla 7.	Ingredientes y composición química de los piensos experimentales	116
Tabla 8.	Composición de los dos tipos de saliva artificial infundidas para obtener el pH alto o el pH bajo en el medio de cultivo	117
Tabla 9.	Efecto del pienso y del pH (alto o bajo) en el medio de cultivo sobre la fermentación ruminal	121
Tabla 10.	Efecto del pienso y del pH (alto o bajo) en el medio de cultivo sobre el perfil y la hidrogenación de los ácidos grasos (AG) en la digesta ruminal	122
Tabla 11.	Ingredientes y composición química de las dietas experimentales	147
Tabla 12.	Efecto de la adición de aceites de origen vegetal al pienso sobre la fermentación ruminal	152
Tabla 13.	Efecto de la fuente de inóculo sobre la cinética de fermentación de tres sustratos	152
Tabla 14.	Efecto de la adición de aceites de origen vegetal sobre el perfil y la biohidrogenación de ácidos grasos en la digesta ruminal	154
Tabla 15.	Ingredientes y composición química de las dietas experimentales	173
Tabla 16.	Efecto de la adición al pienso de aceites de girasol, pescado o algas sobre la fermentación ruminal	179
Tabla 17.	Efecto de la fuente de inóculo sobre la cinética de fermentación de tres sustratos	180
Tabla 18.	Efecto de la adición al pienso de aceites de girasol, pescado o algas sobre el perfil y la biohidrogenación de ácidos grasos en la digesta ruminal	181

RESUMEN

Esta tesis doctoral consiste en un trabajo de investigación constituido por cuatro estudios en los que se han examinado los efectos de varios factores de variación sobre los procesos de degradación y fermentación en el rumen y, de forma más específica, sobre el metabolismo lipídico. En los cuatro estudios se han utilizado métodos *in vitro* de cultivo de los microorganismos del rumen. En el estudio 1 se empleó un incubador ANKOM que es un fermentador sin renovación del medio de cultivo utilizado para estimar la digestibilidad *in vitro* de los alimentos. En los estudios 2, 3 y 4 se utilizó un simulador de la fermentación ruminal (RUSITEC) que consiste en un fermentador de flujo semicontinuo.

Los factores de variación investigados han sido el pH en el medio de incubación (estudios 1 y 2), el tipo de alimento sometido a fermentación ruminal, en particular la proporción de forrajes o alimentos concentrados en el pienso (estudios 1 y 2) y la suplementación lipídica del pienso (estudios 3 y 4) con aceites de origen diverso (vegetal o marino) y muy diferente composición en ácidos grasos insaturados. Por último, se ha analizado la respuesta en las siguientes variables: la degradación del sustrato fermentado (en todos los estudios), el patrón y los productos finales de la fermentación ruminal y los cambios en la hidrogenación de los ácidos grasos de cadena larga insaturados aportados con el pienso, con especial énfasis en la formación de intermediarios (tales como el ácido linoleico conjugado - ALC) en dicho proceso de hidrogenación (estudios 2, 3 y 4).

Estudio 1

Objetivo: estudiar los efectos del inóculo y de condiciones subóptimas del pH en el medio de cultivo sobre la digestibilidad *in vitro* de alimentos con alto contenido en fibra.

Metodología: Se realizaron cuatro experimentos de digestibilidad *in vitro* utilizando el fermentador DAISY (ANKOM). Para inducir condiciones subóptimas de pH en los cultivos de microorganismos ruminales, se añadieron distintos sustratos al medio de fermentación o se modificó la composición de la

disolución amortiguadora. Los dos primeros experimentos se realizaron utilizando ovejas como donantes de digesta ruminal. En el experimento #1, el pH del medio ruminal se modificó añadiendo heno o cebada al medio de cultivo, mientras que en el experimento #2 se emplearon diferentes soluciones amortiguadoras de McIlvaine para hacer variar los valores de pH en el medio de cultivo entre 7,0 y 5,8.

Los experimentos #3 y #4 se realizaron empleando novillos como donantes de digesta ruminal. Para obtener inóculos con diferente composición microbiana, los animales de los que se obtuvo la digesta ruminal recibieron dietas con diferentes proporciones de forraje y alimento concentrado. En ambos experimentos se evaluó el nivel de forraje en la dieta (100, 50 o 20% de forraje) de los novillos empleados como donantes de líquido ruminal sobre el pH del inóculo y la digestibilidad de los alimentos. Además, en el experimento #3, se estudió el efecto de la adición de heno o cebada al medio de fermentación. En el experimento #4 se provocaron cambios en el pH en los cultivos mediante la utilización de diferentes disoluciones tampón para conseguir variar los valores de pH en el medio de cultivo entre 7,0 y 5,0.

Conclusión: La reducción del pH en los cultivos de microorganismos ruminales mediante cambios en la composición del medio de cultivo, la adición de sustratos con un mayor contenido en hidratos de carbono rápidamente fermentables o la inoculación de los cultivos con líquido ruminal de animales alimentados con piensos ricos en concentrados determina una disminución de la digestibilidad *in vitro* de los forrajes. Esta disminución está directamente relacionada con su contenido en fibra.

Estudio 2

Objetivo: estudiar los efectos de la relación forraje: concentrado en el pienso y del pH en el rumen sobre el patrón de fermentación y la composición en ácidos grasos de la digesta en fermentadores RUSITEC.

Metodología: Se utilizaron 16 vasijas de fermentación diseñadas según el sistema de simulación ruminal RUSITEC inoculadas con digesta ruminal de ovejas. El diseño del experimento se ajustó a un modelo factorial 2 x 2: dos piensos empleados como sustrato de fermentación con diferente relación

forraje:concentrado (**pienso F** con un alto contenido en forrajes y **pienso C** con un alto contenido en alimentos concentrados), y dos niveles de pH en el medio de cultivo (**pH alto** = 6,9 y **pH bajo** = 6,4). El experimento tuvo una duración de 3 semanas y durante los últimos 14 días se recogieron las muestras y se realizaron las mediciones oportunas para determinar: el pH en el medio de cultivo, la desaparición de sustrato tras 48 h de incubación, la producción total de gas fermentación y de metano, el volumen de líquido efluente y la concentración en el mismo de ácidos grasos volátiles (AGV), L-lactato y amoníaco), la síntesis de proteína microbiana (utilizando ¹⁵N como marcador) y el perfil de ácidos grasos de cadena larga en la digesta. Los ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía de gases tras la extracción de la grasa y la metilación de los ácidos grasos.

Conclusiones: Al descender el pH ruminal desde 6,9 hasta 6,4 disminuye la digestibilidad del alimento, la producción de gas y la de ácidos grasos de cadena corta, en particular la de acético. También disminuye la degradación de la proteína del alimento, disminuyendo la liberación de amoníaco y la formación de isoácidos de cadena corta, aunque sin llegar a afectar a la síntesis de proteína microbiana. No hay cambios ni en la producción de metano ni en la de los ácidos propiónico, butírico y láctico. Con esa disminución del pH no llegan a observarse diferencias ni en la hidrogenación ni en el perfil de ácidos grasos de cadena larga en la digesta ruminal.

Cuando se digiere un pienso con una mayor proporción de alimentos concentrados, más digestibles, aumenta la producción de gas de fermentación, la de algunos ácidos grasos de cadena corta (butírico, valérico, caproico e isoácidos) y la de ácido láctico y amoníaco, así como la cantidad total de proteína microbiana sintetizada en el rumen. Sin embargo, no se observan cambios en la producción de metano o en la eficiencia de síntesis de la proteína microbiana. Al aumentar la proporción de alimentos concentrados en el pienso se incrementa la hidrogenación del ácido linolénico y se reduce la del ácido oleico, no observándose variaciones en la del ácido linoleico. Como resultado de estos cambios, se observan variaciones en el perfil de ácidos grasos en la digesta ruminal, de forma que las proporciones relativas de ácido

esteárico y de ácido linoleico conjugado (C18:2 c9t11) son más elevadas con una dieta con una mayor proporción de forraje

Estudio 3

Objetivo: investigar los efectos de la adición de diferentes aceites vegetales (oliva, girasol o lino) al pienso sobre el patrón de fermentación ruminal, la producción de metano y la biohidrogenación de los ácidos grasos en fermentadores RUSITEC.

Metodología: Se utilizaron 16 vasijas de fermentación diseñadas según el sistema de simulación ruminal RUSITEC inoculadas con digesta ruminal de ovejas. En el tratamiento **control** la dieta consistió en un pienso integral o ración completa para ovejas en lactación que no contenía ninguna grasa como ingrediente. Los otros tres tratamientos fueron el mismo pienso utilizado en el tratamiento control al que se añadió un aceite de origen vegetal para alcanzar una concentración del 6 % de la materia seca. Se utilizaron tres tipos de aceite, uno para cada uno de los tratamientos: aceite de **oliva**, aceite de **girasol** o aceite de **linaza**. El experimento tuvo una duración de 3 semanas y durante los últimos 14 días se recogieron las muestras y se realizaron las mediciones oportunas para determinar: el pH en el medio de cultivo, la desaparición de sustrato tras 48 h de incubación, la producción total de gas fermentación y de metano, el volumen de líquido efluente y la concentración en el mismo de ácidos grasos volátiles (AGV), L-lactato y amoníaco), la síntesis de proteína microbiana (utilizando ¹⁵N como marcador) y el perfil de ácidos grasos de cadena larga en la digesta. Los ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía de gases tras la extracción de la grasa y la metilación de los ácidos grasos.

Conclusiones: El patrón de fermentación ruminal cambia al añadir un 6 % de aceite de oliva, de girasol o de linaza a piensos de ovejas lecheras, observándose una disminución de la ratio acetato:propionato y una reducción de la producción de metano y de la liberación de amoníaco, sin llegar a afectar a la eficiencia de síntesis de la proteína microbiana. La adición de estos aceites disminuye la actividad amilolítica y celulolítica en los fermentadores, especialmente con el aceite de linaza. La adición de aceites de oliva, girasol o

linaza disminuye la hidrogenación de los ácidos grasos de cadena larga en el rumen, afectando de forma diferente a la saturación de cada ácido graso dependiendo de la composición en ácidos grasos insaturados de cada aceite utilizado como suplemento. De esta forma, el perfil de ácidos grasos de la digesta depende, por un lado, del perfil de ácidos grasos del aceite añadido al pienso y, por otro lado, de la medida en que cada aceite afecte a la hidrogenación de los ácidos grasos insaturados oleico, linoleico y linolénico.

Estudio 4

Objetivo: investigar los efectos de la adición de aceite de girasol, o de mezclas de este aceite con aceite de pescado o de algas marinas, a raciones ricas en concentrados sobre el patrón de fermentación ruminal, la producción de metano y la biohidrogenación de los ácidos grasos en fermentadores RUSITEC.

Metodología: Se utilizaron 16 vasijas de fermentación diseñadas según el sistema de simulación ruminal RUSITEC inoculadas con digesta ruminal de ovejas. Los tratamientos experimentales fueron: pienso control (ración completa para ovejas en lactación) sin aceite añadido (**Control**), pienso control al que se añadió un 2 % de aceite de girasol (**Girasol**), pienso control suplementado con un 2 % de aceite de girasol más un 1 % de aceite de pescado (**Pescado**) y pienso control suplementado con un 2 % de aceite de girasol más un 1 % de aceite de algas (**Algas**). El experimento tuvo una duración de 3 semanas y durante los últimos 14 días se recogieron las muestras y se realizaron las mediciones oportunas para determinar: el pH en el medio de cultivo, la desaparición de sustrato tras 48 h de incubación, la producción total de gas fermentación y de metano, el volumen de líquido efluente y la concentración en el mismo de ácidos grasos volátiles (AGV), L-lactato y amoníaco), la síntesis de proteína microbiana (utilizando ¹⁵N como marcador) y el perfil de ácidos grasos de cadena larga en la digesta. Los ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía de gases tras la extracción de la grasa y la metilación de los ácidos grasos.

Conclusiones: La adición de un 1 % de aceite de pescado o de algas a un pienso de ovejas lecheras ya suplementado con un 2 % de aceite de girasol

no afecta a la digestibilidad del alimento; pero reduce significativamente la producción de metano al ser fermentado en el rumen. Además, se producen cambios en el patrón de fermentación ruminal, observándose una disminución de la ratio acetato:propionato y una mayor producción total de ácidos grasos volátiles y de ácido láctico, sin afectar a la síntesis de la proteína microbiana. La adición de estos aceites no afecta a la actividad celulolítica en los fermentadores, observándose tan solo una pequeña disminución del ritmo de fermentación del almidón. La adición conjunta de aceites de pescado o algas y de aceite de girasol al pienso disminuye la hidrogenación de los ácidos grasos de cadena larga en el rumen, con un efecto diferente sobre la saturación de cada ácido graso. De esta forma, se producen variaciones en el perfil de ácidos grasos de la digesta en respuesta a la adición de los aceites de pescado o de algas, entre las que cabe destacar un aumento en la proporción relativa de ácido linoleico conjugado (C18:2 c9t11).

Conclusión final

La suplementación lipídica de piensos para rumiantes de alta producción afecta a los procesos de fermentación y de hidrogenación de los ácidos grasos de cadena larga en el rumen. Los efectos más consistentes son una disminución de la producción de metano y una reducción de la hidrogenación de los ácidos grasos insaturados, que afecta de forma diferente a los ácidos oleico, linoleico y linolénico, determinando la formación de ciertos ácidos grasos no contenidos en el alimento (tales como el vaccénico o el ácido linoleico conjugado) que pasan al abomaso y serán absorbidos en el intestino delgado. La magnitud de estos efectos es variable, dependiendo de la composición de la dieta, en particular de la cantidad de forraje y concentrado en el pienso, de la cantidad de grasa añadida al pienso y de su composición en cuanto a contenido en ácidos grasos más o menos insaturados.

1. INTRODUCCIÓN, PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA Y OBJETIVOS

Para poder satisfacer las necesidades nutritivas de los animales con elevados niveles de producción es preciso utilizar piensos con una elevada concentración en energía y nutrientes. Con el propósito de alcanzar este objetivo, en los piensos para rumiantes (sobre todo para vacas, cabras y ovejas lecheras) se incrementa la proporción de alimentos concentrados reduciendo la de forrajes en la ración, y se incorporan ingredientes con un alto contenido en energía, tales como grasas de diferente origen. La utilización de estas dietas provoca cambios importantes en los procesos de fermentación microbiana en el rumen con consecuencias sobre la productividad, la salud, y el bienestar de los animales, la calidad de los productos (carne o leche) que se obtienen de ellos, y el impacto medioambiental de la explotación de los animales.

La suplementación lipídica de los piensos puede afectar a la digestión de los nutrientes y a la formación de productos finales de la fermentación tales como el gas metano. Además, muchos de los ácidos grasos insaturados de cadena larga que componen los triglicéridos de los alimentos son hidrogenados en el rumen, de forma que en el intestino se absorben mayoritariamente ácidos grasos saturados que son los que finalmente aparecen en la carne o la leche producidas. Todos estos procesos han sido estudiados durante las últimas décadas, siendo especialmente importante la investigación sobre los aspectos que afectan a los procesos de digestión y fermentación microbiana de los lípidos en el rumen, y a los factores nutricionales que los afectan.

El ácido linoleico conjugado (ALC) comprende un grupo complejo de isómeros del ácido linoleico que se pueden detectar en la grasa de la carne y, fundamentalmente, de la leche obtenidas de los rumiantes. Más del 70 % del ALC en la grasa de la leche corresponde al isómero C18:2 c9t11, también llamado ácido ruménico, ya que se forma en el rumen como resultado de la hidrogenación incompleta del ácido linoleico ingerido con el alimento ([Ferlay y col., 2017](#)). La hidrogenación consiste en una primera isomerización en la que el doble enlace *cis*-12 del ácido linoleico es transferido con configuración *trans* al carbono 11 para dar lugar a ácido ruménico. A partir de este compuesto, se

produce una hidrogenación progresiva de los dobles enlaces hasta saturar completamente los ácidos grasos ([Harfoot y Hazlewood, 1997](#)); hidrogenándose en primer lugar el enlace *cis*-9 para formar ácido vaccénico (C18:1 *t*11), con una reducción posterior del enlace *trans*-11 para dar lugar finalmente a ácido esteárico (C18:0) ([Doreau y col., 2012](#)). Sin embargo, en función de diversos factores, la hidrogenación ruminal no es completa, de forma que al duodeno pueden llegar algunos ácidos grasos insaturados y determinados metabolitos intermediarios ([Stanton y col., 2003](#)) que se absorben en el intestino y pueden aparecer en los productos finales (leche y carne). Además, el ácido ruménico también puede sintetizarse en la glándula mamaria a partir de vaccénico, lo que determina un mayor contenido de ALC en la leche ([Griinari y Bauman, 1999](#); [Griinari y col., 2000](#); [Bauman y col., 2011](#)).

El ALC es considerado un nutriente funcional, al que se le han atribuido diversos efectos potencialmente beneficiosos para la salud del consumidor ([Pariza y col., 2001](#); [Park y Pariza, 2007](#)). El ALC ha sido considerado un compuesto con actividad antiarteriosclerótica, antiinflamatoria, antidiabética y anticarcinogénica, así como potenciadora del sistema inmune; ([Khanal, 2004](#); [Pariza, 2004](#); [Weiss y col., 2004a](#); [Chowdhury y col., 2014](#); [Bialek y col., 2017](#)). Además, el ALC inhibe la síntesis de ácidos grasos, reduciendo la acumulación de grasa corporal en individuos con sobrepeso ([Weiss y col., 2004b](#)).

El estudio de los factores que afectan al contenido en ALC de la leche es uno de los temas de investigación más importantes en la actualidad dentro del ámbito de la nutrición de los rumiantes ([Chilliard y col., 2003](#); [Chilliard y Ferlay, 2004](#); [Castro y col., 2009](#); [Kim y col., 2009](#); [Prandini y col., 2009](#); [Tsiplakou y col., 2009](#)), con la finalidad de obtener información sobre la posibilidad y los mecanismos que permiten aumentar dicho contenido. Por estos motivos, hay un considerable interés por conocer los factores y mecanismos que determinan la concentración de ALC en la leche y la carne de los rumiantes y por establecer estrategias nutricionales para incrementarla. Entre los factores que afectan al contenido en ALC de la leche y la carne de los rumiantes, cabe mencionar aquellos relacionados con la alimentación de los animales que influyen sobre los procesos de fermentación e hidrogenación de los ácidos

grasos en el rumen ([Kliem y Shingfield, 2016](#)). Dentro de estos factores, algunos de los más influyentes son el pH en el rumen (a menor pH, menor hidrogenación), la relación forraje:concentrado del pienso (a menor proporción de forraje, menor hidrogenación), la composición de la grasa contenida en el alimento o suplementada al pienso (a mayor grado de saturación de los ácidos grasos, menor hidrogenación) o la cantidad de ácidos grasos consumida por los animales (el consumo de grandes cantidades de ácidos grasos insaturados puede colapsar el proceso de hidrogenación ruminal).

El contenido en ALC en la leche es mayor en animales que reciben raciones con una mayor proporción de forraje, puede estar afectado por el tipo de forraje administrado y es mayor en animales en pastoreo que cuando reciben forrajes conservados (ensilados) ([Weiss y col., 2004a](#); [Weiss y col., 2004b](#); [Mele y col., 2006](#); [Mohammed y col., 2006](#)). También se ha observado un aumento del contenido en ALC en la leche cuando los animales son alimentados con dietas suplementadas con lípidos ricos en ácidos insaturados. Por su coste, las grasas de pescado y los aceites vegetales son los suplementos más asequibles. La suplementación de los piensos con aceites de pescado ([Chouinard y col., 2001](#); [AbuGhazaleh y col., 2003](#); [AbuGhazaleh y col., 2004](#); [Shingfield y col., 2006](#)) aumenta el contenido de ALC en la leche, sin producir cambios en sus características organolépticas, ni en las de sus productos derivados ([Baer y col., 2001](#); [Ramaswamy y col., 2001](#); [Campbell y col., 2003](#)). Los ácidos grasos poliinsaturados que contienen los aceites de pescado parecen inhibir la etapa final de hidrogenación (conversión de vaccénico a esteárico), favoreciendo la acumulación de vaccénico en el rumen ([AbuGhazaleh y Jenkins, 2004](#); [Chow y col., 2004](#)) y la síntesis posterior de ALC en la glándula mamaria ([Toral y col., 2010](#)).

La suplementación con aceites de origen vegetal ricos en ácidos linoleico y α -linolénico (soja, algodón, girasol, lino, cártamo y colza) también da como resultado un aumento de la concentración de ALC en la leche ([Stanton y col., 2003](#); [Khanal y Olson, 2004](#)). Los aceites con un mayor contenido en ácido linoleico (girasol, soja) parecen ser más efectivos ([Kelly y col., 1998](#); [Dhiman y col., 2000](#); [Lock y Garnsworthy, 2002](#); [Collomb y col., 2004](#); [Hervás y col., 2006](#); [Shingfield y col., 2006](#); [Hur y col., 2017](#)). Esto podría ser debido a que el

ácido linoleico favorece la formación de ALC en el rumen, mientras que el α -linolénico únicamente contribuye a incrementar los niveles de vaccénico en el rumen a partir del cual se forma ALC por vía endógena en la glándula mamaria ([Luna y col., 2004](#)). La forma de incorporación de las grasas en la dieta también es importante, siendo efectivas cuando se adicionan en forma de aceite extraído de las semillas o cuando se añaden directamente las semillas oleaginosas sometidas a un tratamiento térmico previo ([Dhiman y col., 2000](#); [Chouinard y col., 2001](#); [Secchiari y col., 2003](#); [Hoffmann y col., 2015](#)).

Aunque se dispone de abundante información sobre las variaciones en el contenido en ALC y vaccénico en la carne y la leche en respuesta a los factores nutricionales anteriormente descritos, hay mucha menos información acerca de los efectos de dichos factores sobre la formación de dichos compuestos en el rumen durante la hidrogenación de los ácidos grasos insaturados. El estudio de la digestión en el rumen se complica porque es más complejo acceder a esta cavidad del tracto digestivo para tomar muestras y realizar determinaciones, así como controlar con precisión y de forma independiente cada uno de los factores de variación. El fermentador RUSITEC (Rumen Simulation TEChnique) es un quimiostato en el que se pueden simular, *in vitro* y en condiciones controladas, los procesos de fermentación ruminal durante periodos relativamente largos. De este modo, el RUSITEC se presenta como una herramienta útil para estudiar los procesos de fermentación y los cambios que se producen en respuesta a algún factor de variación.

Por último, es importante advertir que los factores que afectan al metabolismo lipídico en el rumen, también pueden tener un efecto concurrente sobre los procesos de fermentación microbiana de los hidratos de carbono y los compuestos nitrogenados ([Coppock y Wilks, 1991](#)). Así, debido al potencial efecto inhibidor de los lípidos sobre el metabolismo microbiano, un aporte de alimentos con elevados contenidos en grasa puede provocar una inhibición de la fermentación ruminal, disminuyendo significativamente la digestibilidad del alimento ([Harfoot y Hazlewood, 1997](#); [Hess y col., 2008](#)). La suplementación lipídica de los piensos también puede provocar una reducción significativa de la formación de metano ([Toprak, 2015](#); [Broucek, 2018](#)).

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto se considera justificada la realización de estudios para ampliar el conocimiento sobre los procesos de hidrogenación ruminal de los ácidos grasos y la posibilidad de aumentar la formación de ALC en el rumen mediante cambios en la composición de la dieta, tales como una suplementación lipídica adecuada de los piensos que consumen los animales. Para que dichos estudios sean suficientemente holísticos, deben incluir la observación de todos los procesos de fermentación microbiana en el rumen como un todo.

Por todo ello, el objetivo general de esta tesis es investigar los efectos de varios factores de variación (pH del rumen, composición de la dieta, suplementación lipídica del pienso) sobre los procesos de fermentación microbiana en el rumen, en particular sobre la hidrogenación de los ácidos grasos de cadena larga. Para abordar este objetivo, se plantearon varios objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto del pH del medio de cultivo sobre la digestibilidad de los forrajes.
2. Examinar los procesos de hidrogenación de ácidos grasos y de formación de ALC y vaccénico en el rumen, mediante el estudio de la fermentación ruminal en el simulador RUSITEC.
3. Analizar las diferencias en el perfil de ácidos grasos de cadena larga de la digesta observadas cuando se cambia la relación forraje:concentrado de un pienso suplementado con aceite de girasol o cuando se reduce el pH en el medio de cultivo.
4. Estudiar las variaciones en el perfil de ácidos grasos de la digesta provocados por la adición de aceites vegetales con distintas proporciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados (oliva, girasol o lino).
5. Estudiar las variaciones en el perfil de ácidos grasos de la digesta inducidos por la adición de aceite de pescado o aceite de algas a un pienso ya suplementado con aceite de girasol.
6. Investigar los efectos de los factores anteriormente mencionados sobre la degradación y fermentación de los compuestos del alimento, en particular sobre la digestión de los polisacáridos estructurales (fibra), la

producción de metano y de metabolitos finales de la fermentación y la síntesis de proteína microbiana.

Para la consecución de estos objetivos se diseñaron los estudios concretos que serán presentados en los capítulos de esta memoria, proponiendo para cada estudio los objetivos que se definen en cada caso.

1.1 BIBLIOGRAFIA

- AbuGhazaleh, A. A., and Jenkins, T. C. (2004). Short communication: Docosahexaenoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. *Journal of Dairy Science*, 87, 1047-1050.
- AbuGhazaleh, A. A., Schingoethe, D. J., Hippen, A. R., and Kalscheur, K. F. (2003). Milk conjugated linoleic acid response to fish oil supplementation of diets differing in fatty acid profiles. *Journal of Dairy Science*, 86, 944-953.
- AbuGhazaleh, A. A., Schingoethe, D. J., Hippen, A. R., and Kalscheur, K. F. (2004). Conjugated linoleic acid increases in milk when cows fed fish meal and extruded soybeans for an extended period of time. *Journal of Dairy Science*, 87, 1758-1766.
- Baer, R. J., Ryali, J., Schingoethe, D. J., Kasperson, K. M., Donovan, D. C., Hippen, A. R., and Franklin, S. T. (2001). Composition and properties of milk and butter from cows fed fish oil. *Journal of Dairy Science*, 84, 345-353.
- Bauman, D. E., Harvatine, K. J., and Lock, A. L. (2011). Nutrigenomics, rumen-derived bioactive fatty acids, and the regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition*, 31, 299-319.
- Białek, M., Czauderna, M., and Białek, A. (2017). Conjugated linolenic acid (CLnA) isomers as new bioactive lipid compounds in ruminant-derived food products. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 26, 3-17.
- Broucek, J. (2018). Options to methane production abatement in ruminants: A review. *JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences*, 28, 348-364.
- Campbell, W., Drake, M. A., and Larick, D. K. (2003). The impact of fortification with conjugated linoleic acid (CLA) on the quality of fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 86, 43-51.
- Castro, T., Manso, T., Jimeno, V., Del Alamo, M., and Mantecon, A. R. (2009). Effects of dietary sources of vegetable fats on performance of dairy ewes and conjugated linoleic acid (CLA) in milk. *Small Ruminant Research*, 84, 47-53.
- Chilliard, Y., and Ferlay, A. (2004). Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Development*, 44, 467-492.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J., and Lamberet, G. (2003). A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *Journal of Dairy Science*, 86, 1751-1770.
- Chouinard, P. Y., Corneau, L., Butler, W. R., Chilliard, Y., Drackley, J. K., and Bauman, D. E. (2001). Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *Journal of Dairy Science*, 84, 680-690.
- Chow, T. T., Fievez, V., Moloney, A. P., Raes, K., Demeyer, D., and De Smet, S. (2004). Effect of fish oil on *in vitro* rumen lipolysis, apparent biohydrogenation of linoleic and linolenic acid and accumulation of biohydrogenation intermediates. *Animal Feed Science and Technology*, 117, 1-12.

- Chowdhury, R., Warnakula, S., Kunutsor, S., Crowe, F., Ward, H. A., and Johnson, L. (2014). Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk a systematic review and meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*, 160, 658-658.
- Collomb, M., Sieber, R., and Butikofer, U. (2004). CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. *Lipids*, 39, 355-364.
- Coppock, C. E., and Wilks, D. L. (1991). Supplemental fat in high-energy rations for lactating cows: effects on intake, digestion, milk yield, and composition. *Journal of Animal Science*, 69, 3826-3837.
- Dhiman, T. R., Satter, L. D., Pariza, M. W., Galli, M. P., Albright, K., and Tolosa, M. X. (2000). Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *Journal of Dairy Science*, 83, 1016-1027.
- Doreau, M., Fievez, V., Troegeler-Meynadier, A., and Glasser, F. (2012). Métabolisme ruminal et digestion des acides gras longs chez le ruminant: le point des connaissances récentes. *INRA Productions Animales*, 25, 361-374.
- Ferlay, A., Bernard, L., Meynadier, A., and Malpuech-Brugère, C. (2017). Production of trans and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. *Biochimie*, 141, 107-120.
- Griinari, J. M., Corl, B. A., Lacy, S. H., Chouinard, P. Y., Nurmela, K. V. V., and Bauman, D. E. (2000). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *Journal of Nutrition*, 130, 2285-2291.
- Griinari, M. K., and Bauman, D. E. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, y G. J. Nelson (Eds.), *Advances in conjugated linoleic acid research* (Vol. 1, pp. 180-200). Champaign, Ill. USA: AOCS Press.
- Harfoot, C. G., and Hazlewood, G. P. (1997). Lipid metabolism in the rumen. In P. N. Hobson y C. S. Stewart (Eds.), *The Rumen microbial ecosystem*. London; New York: Blackie Academic & Professional.
- Hervás, G., Luna, P., Mantecon, A. R., Castañares, N., Frutos, P., de la Fuente, M. A., and Juárez, M. (2006, 1 - 4 October). *Effect of sunflower oil on sheep milk production and composition, and in vitro rumen fermentation*. Paper presented at the 4th Euro Fed Lipid Congress; Fats, Oils and Lipids for a Healthier Future - Workshop on "Biohydrogenation", University of Madrid (UCM), Spain.
- Hess, B. W., Moss, G. E., and Rule, D. C. (2008). A decade of developments in the area of fat supplementation research with beef cattle and sheep. *Journal of Animal Science*, 86, E188-204.
- Hoffmann, A., Steingass, H., Schollenberger, M., Terry, H., Hartung, K., Weiss, E., and Mosenthin, R. (2015). Effects of different forms and origins of oilseeds on dynamics of ruminal biohydrogenation of long-chain fatty acids in vitro. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99, 1031-1038.

- Hur, S. J., Kim, H. S., Bahk, Y. Y., and Park, Y. (2017). Overview of conjugated linoleic acid formation and accumulation in animal products. *Livestock Science*, 195, 105-111.
- Kelly, M. L., Berry, J. R., Dwyer, D. A., Griinari, J. M., Chouinard, P. Y., Van Amburgh, M. E., and Bauman, D. E. (1998). Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *Journal of Nutrition*, 128, 881-885.
- Khanal, R. C. (2004). Potential health benefits of conjugated linoleic acid (CLA): A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 17, 1315-1328.
- Khanal, R. C., and Olson, K. C. (2004). Factors affecting conjugated linoleic acid (CLA) content in milk, meat, and egg: A review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3, 82-98.
- Kim, E. J., Huws, S. A., Lee, M. R. F., and Scollan, N. D. (2009). Dietary transformation of lipid in the rumen microbial ecosystem. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22, 1341-1350.
- Kliem, K. E., and Shingfield, K. J. (2016). Manipulation of milk fatty acid composition in lactating cows: Opportunities and challenges. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118, 1661-1683.
- Lock, A. L., and Garnsworthy, P. C. (2002). Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. *Animal Science*, 74, 163-176.
- Luna, P., Fontecha, J., Juárez, M., and De la Fuente, M. A. (2004, Octubre). *Effects of a diet supplemented with linseed on the polyunsaturated fatty acid content in ewes' milk*. Paper presented at the Simposium Internacional: Future of the sheep and goats dairy sector, Zaragoza, Spain.
- Mele, M., del Viva, M., Serra, A., Conte, G., and Secchiari, P. (2006, 1 - 4 October). *Effect of forage/concentrate ratio and soybean oil supplementation on C18:1 and CLA isomers in milk fat from Saanen goats*. Paper presented at the 4th Euro Fed Lipid Congress; Fats, Oils and Lipids for a Healthier Future - Workshop on "Biohydrogenation", University of Madrid (UCM), Spain.
- Mohammed, R., O'Donovan, M., Stanton, C. S., Mee, J. F., Murphy, J. J., Glimm, D., and Kennelly, J. J. (2006, 1 - 4 October). *Effect of grazed grass, zero-grazed grass and conserved grass on trans vaccenic acid and cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid concentrations in rumen, plasma and milk of dairy cows*. Paper presented at the 4th Euro Fed Lipid Congress; Fats, Oils and Lipids for a Healthier Future - Workshop on "Biohydrogenation", University of Madrid (UCM), Spain.
- Pariza, M. W. (2004). Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 1132S-1136S.
- Pariza, M. W., Park, Y., and Cook, M. E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*, 40, 283-298.
- Park, Y., and Pariza, M. W. (2007). Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). *Food Research International*, 40, 311-323.
- Prandini, A., Sigolo, S., and Piva, G. (2009). Conjugated linoleic acid (CLA) and fatty acid composition of milk, curd and Grana Padano cheese in conventional and organic farming systems. *Journal of Dairy Research*, 76, 278-282.

- Ramaswamy, N., Baer, R. J., Schingoethe, D. J., Hippen, A. R., Kasperson, K. M., and Whitlock, L. A. (2001). Composition and flavor of milk and butter from cows fed fish oil, extruded soybeans, or their combination. *Journal of Dairy Science*, 84, 2144-2151.
- Secchiari, P., Antongiovanni, M., Mele, M., Serra, A., Buccioni, A., Ferruzzi, G., Paoletti, F., and Petacchi, F. (2003). Effect of kind of dietary fat on the quality of milk fat from Italian Friesian cows. *Livestock Production Science*, 83, 43-52.
- Shingfield, K. J., Reynolds, C. K., Hervás, G., Griinari, J. M., Grandison, A. S., and Beever, D. E. (2006). Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89, 714-732.
- Stanton, C., Murphy, J., McGrath, E., and Devery, R. (2003). Animal feeding strategies for conjugated linoleic acid enrichment of milk. In J. L. Sébédio, W. W. Christie, y R. Adlof (Eds.), *Advances in conjugated linoleic acid research* (Vol. 2, pp. 123-143). Champaign, USA: AOCS Press.
- Toprak, N. N. (2015). Do fats reduce methane emission by ruminants? A review. *Animal Science Papers and Reports*, 33, 305-321.
- Toral, P. G., Shingfield, K. J., Hervas, G., Toivonen, V., and Frutos, P. (2010). Effect of fish oil and sunflower oil on rumen fermentation characteristics and fatty acid composition of digesta in ewes fed a high concentrate diet. *Journal of Dairy Science*, 93, 4804-4817.
- Tsiplakou, E., Flemetakis, E., Kalloniati, C., Papadomichelakis, G., Katinakis, P., and Zervas, G. (2009). Sheep and goats differences in CLA and fatty acids milk fat content in relation with mRNA stearoyl-CoA desaturase and lipogenic genes expression in their mammary gland. *Journal of Dairy Research*, 76, 392-401.
- Weiss, M. F., Martz, F. A., and Lorenzen, C. L. (2004a). Review: Conjugated linoleic acid: Historical context and implications. *The Professional Animal Scientist*, 20, 118-126.
- Weiss, M. F., Martz, F. A., and Lorenzen, C. L. (2004b). Review: Conjugated linoleic acid: Implicated mechanisms related to cancer, atherosclerosis and obesity. *The Professional Animal Scientist*, 20, 127-135.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 EL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO

De acuerdo con el “*Food Information Council*” la expresión alimento funcional hace referencia a aquellos alimentos que, además de aportar nutrientes y energía, contienen componentes biológicamente activos que pueden afectar a una o varias funciones específicas del organismo. Como consecuencia de ese efecto específico, los alimentos funcionales pueden mejorar la salud y el bienestar de los individuos que los consumen, así como reducir el riesgo de contraer enfermedades. Para ser considerado funcional, el efecto causado debe ir más allá de la nutrición básica, es decir de la provisión de energía o de los compuestos que sirven de unidades estructurales para la síntesis de moléculas de los tejidos o de los productos, tales como aminoácidos ([Fuquay y col., 2011](#)). Esta definición explica el interés y disposición de los consumidores por acceder a alimentos que, además de nutrir, tengan el potencial de mejorar o proteger su salud y bienestar.

El ácido linoleico conjugado (ALC) es un ácido graso insaturado de 18 C considerado como un compuesto nutracéutico responsable de los efectos de los alimentos funcionales que lo contienen. El ALC se refiere a un grupo complejo de isómeros posicionales y geométricos conjugados del ácido linoleico (C18:2 c9c12), que se encuentra de forma natural en la grasa de alimentos derivados de rumiantes: carne y, fundamentalmente, productos lácteos ([Shingfield y col., 2006](#)). Aunque se han detectado distintos isómeros posicionales (7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14) y geométricos (*cis-trans*, *trans-cis*, *trans-trans* y *cis-cis*) del ALC en la grasa de la leche, más del 70 % del contenido en ALC corresponde al isómero C18:2 c9t11 o ácido ruménico, al que se atribuyen la mayoría de sus propiedades biológicas. Otro isómero del ALC que está siendo también objeto de investigación por su implicación en la inhibición de la síntesis de grasa en mamíferos, es el C18:2 t10c12, aunque su contenido en la grasa láctea es muy pequeño (< 1 % sobre el total de ALC) y sus efectos sobre la salud humana son cuestionados por la comunidad científica ([Shingfield y col., 2004](#)).

El C18:2 c9t11 no es sólo una molécula combustible que interviene en procesos metabólicos de obtención y almacenamiento de energía, sino que, además, posee una actividad biológica relevante e interviene en otros procesos

funcionales de la célula ([Weiss y col., 2004b](#); [Weiss y col., 2004a](#)). Los efectos beneficiosos del C18:2 c9t11 sobre la salud, observados experimentalmente sobre todo en modelos animales, son actividad antiarteriosclerótica, antiinflamatoria, antidiabética y, sobre todo, anticarcinogénica (inhibe la mutagénesis), así como potenciador del sistema inmune ([Belury, 2002](#); [Khanal, 2004](#); [Pariza, 2004](#); [Weiss y col., 2004b](#)). Además, el C18:2 c9t11 inhibe la síntesis de ácidos grasos, reduciendo la acumulación de grasa corporal en individuos con sobrepeso. Sin embargo, estos efectos no han sido comprobados de forma concluyente en los humanos. En líneas generales, las concentraciones totales de C18:2 c9t11 en la leche de los rumiantes oscilan entre un 0,3 y un 2,0 % del total de ácidos grasos de la grasa de leche ([Khanal y Dhiman, 2007](#)).

2.1.1 Formación del ácido linoleico conjugado (C18:2 c9t11) en el rumen

2.1.1.1 La digestión microbiana en el rumen

La microbiología y los procesos de digestión microbiana en el rumen han sido objeto de numerosas revisiones bibliográficas, entre las que podría destacarse la obra clásica editada por [Hobson y Stewart \(1997\)](#). El estado de la cuestión ha sido actualizado en un compendio de revisiones recopiladas en el libro editado por [Millen y col. \(2016\)](#). Los rumiantes son animales con un aparato digestivo característico, ya que su estómago es policavitario y comprende cuatro compartimentos: retículo, rumen, omaso y abomaso. El retículo, el rumen y el omaso han sido denominados preestómagos, ya que se ubican antes de las partes del tubo digestivo en las que tiene lugar la digestión gástrica (abomaso) y la digestión y absorción intestinal (intestino delgado). El rumen es un compartimento de gran volumen (> 100 L de capacidad en un vacuno adulto) en el que se asienta una numerosa y diversa población microbiana con más de 200 especies de bacterias en concentraciones de 10^{10} - 10^{11} células/mL, varias especies de arqueas metanogénicas (10^6 - 10^8 células/mL), unas 25 especies de protozoos (10^4 - 10^6 células/mL), hongos y levaduras (10^3 - 10^5 células/mL), además de virus bacteriófagos, micoplasmas y otros microorganismos ([Mackie y col., 2002](#); [Russell, 2002](#)). Las diferentes especies de microorganismos tienen roles diferentes, interactuando entre sí mediante actividades metabólicas complementarias. Con la excepción de la formación de metano, la mayoría de las

especies microbianas tienen más de un rol o actividad metabólica ([Lourengo y col., 2010](#); [Millen y col., 2016](#); [Nagaraja, 2016](#)). Todas las especies son esenciales para sostener la comunidad microbiana y su actividad colectiva.

Los microorganismos del rumen requieren un ambiente anaerobio con alto contenido en agua, una temperatura de 38-39 °C y un potencial redox de 150-350 mV (elevado poder reductor). Estas condiciones son las que prevalecen en el rumen, con pequeñas variaciones que dependen, sobre todo, del tipo y cantidad de alimentos que consume el animal ([Van Soest, 1994](#); [Ishler y col., 1996](#); [Russell, 2002](#)).

Entre la microbiota del rumen y el animal hospedador se establece una relación simbiótica. Los microorganismos encuentran en el rumen un ambiente óptimo para su supervivencia y crecimiento y un aporte continuo de nutrientes (a partir del alimento que llega al rumen). Por su parte, gracias a la actividad de los microorganismos el rumiante puede digerir componentes del alimento que no podría hidrolizar con sus propias enzimas digestivas (carbohidratos estructurales), utiliza como nutrientes los productos finales de la fermentación microbiana (p. ej., ácidos grasos volátiles) e incluso aprovecha las propias células microbianas que salen del rumen hacia el abomaso como una fuente de nutrientes (en particular de aminoácidos). Los microorganismos también se benefician de los movimientos de mezclado y de la eliminación de gases de fermentación y la retirada de partículas no digeridas que circulan hacia el tracto digestivo posterior. Además, en el rumen se produce la eliminación de los productos finales de la fermentación (productos de desecho para los microorganismos), bien mediante su absorción directa a través de la pared ruminal o bien mediante el flujo de digesta al abomaso ([Orskov, 1982](#); [Orskov, 2012](#); [Millen y col., 2016](#)).

2.1.1.2 Digestión ruminal de carbohidratos, proteínas y lípidos

Una fracción de los carbohidratos y de la proteína del alimento es degradada por los microorganismos del rumen, mientras que el resto llega al abomaso sin haber sido degradado ([Orskov, 1982](#); [Orskov, 2012](#); [Millen y col., 2016](#)).

Con respecto a los carbohidratos que son digeridos en el rumen, los polisacáridos, tanto estructurales (celulosa y otros polisacáridos de la pared

celular vegetal) como no estructurales (almidón), son hidrolizados por enzimas microbianas hasta monosacáridos que son fermentados por los microorganismos para obtener energía. Los productos finales de dicha fermentación son ácidos grasos de cadena corta o volátiles (AGV), gases de fermentación (CO_2 y CH_4), energía en forma de ATP disponible para el crecimiento microbiano y calor de fermentación. Los AGV (fundamentalmente ácidos acético (C_2), propiónico (C_3) y butírico (C_4)) constituyen, posteriormente, el principal aporte de energía para el rumiante ([van Houtert, 1993](#); [Morvay y col., 2011](#)).

Las proteínas de los alimentos que llegan al rumen son hidrolizadas por la acción de proteasas microbianas hasta péptidos y aminoácidos. A su vez, los aminoácidos pueden ser degradados hasta compuestos nitrogenados simples (amoníaco) y ácidos orgánicos, entre ellos isoácidos (tales como el isobutírico y el isovalérico). Si el alimento contiene compuestos nitrogenados no proteicos, estos pueden ser degradados hasta amoníaco. El amoníaco es utilizado por los microorganismos como precursor para sintetizar aminoácidos. Así, utilizando aminoácidos procedentes de la hidrólisis de las proteínas del alimento junto con los aminoácidos sintetizados a partir del amoníaco, los microorganismos sintetizan la proteína microbiana, aquella que forma parte de sus células. De este modo, la proteína que llega al abomaso, y posteriormente al intestino delgado, es una mezcla de proteína microbiana y de proteína del alimento que no fue degradada en el rumen ([Leng y Nolan, 1984](#); [Uden, 2006](#); [Karlsson y col., 2009](#)).

En el caso de los lípidos, los procesos que tienen lugar en el rumen son: lipólisis o hidrólisis completa de los glicéridos del alimento, hidrogenación de los ácidos grasos insaturados no esterificados y síntesis de ácidos grasos de origen microbiano ([Latham y col., 1972](#); [Palmquist y Jenkins, 1980](#); [Millen y col., 2016](#)). Los principales lípidos presentes en los alimentos que consumen los rumiantes son los galactolípidos y fosfolípidos en los forrajes y los triglicéridos en semillas oleaginosas y en aceites o grasas añadidos a los alimentos concentrados. Tanto los galactolípidos como los triglicéridos suelen contener ácidos grasos insaturados. En el rumen, los enlaces éster de estos lípidos son hidrolizados por lipasas microbianas (p. ej., lipasas, galactolipasas, fosfolipasas). Los forrajes pueden contener algunas lipasas (galacto y fosfolipasas) que pueden seguir activas en el rumen tras la ingestión del forraje ([Buccioni y col., 2012](#)). La

hidrólisis de estas grasas se cataliza, fundamentalmente, por acción de lipasas producidas por microorganismos ruminales, sobre todo las producidas por bacterias del género *Butyrivibrio* ([Lourenco y col., 2010](#); [Ferlay y col., 2017](#)). Algunos forrajes pueden contener cantidades apreciables de polifenol oxidasa con cierta capacidad de protección de las grasas y de reducción de la lipólisis ([Lee y col., 2010](#)). En los animales que reciben dietas con cereales o que se suplementan con aceites, los lípidos ingeridos están principalmente en la forma de triacilglicéridos. La hidrólisis de estos lípidos ocurre de forma rápida por la acción de las lipasas microbianas ([Ferlay y col., 2017](#)). Las bacterias son los microorganismos ruminales más activos en la lipólisis ruminal. *Anaerovibrio lipolyticus* (también llamada *A. lipolytica*) es la más especie más activa en relación con la hidrólisis de triglicéridos, mientras que los galacto y fosfolípidos de los forrajes son hidrolizados por *Butyrivibrio* spp. ([Lourenco y col., 2010](#)). También tienen capacidad lipolítica bacterias de los géneros *Clostridium* y *Propionibacterium* ([Ferlay y col., 2017](#)).

Los productos que se liberan tras la hidrólisis de las grasas en el rumen son galactosa (de los galactolípidos), glicerol y ácidos grasos de cadena larga no esterificados. Tanto el azúcar como el glicerol son fermentados hasta ácidos grasos volátiles ([Jenkins y col., 2008](#); [Millen y col., 2016](#)). Los microorganismos ruminales no tienen capacidad para degradar los ácidos grasos de cadena larga. Sin embargo, el contenido ruminal es altamente reductor debido a la liberación de H_2 que se produce al fermentarse los carbohidratos. Como consecuencia de este elevado poder reductor se produce la biohidrogenación parcial o total de los ácidos grasos de cadena larga insaturados, saturándose los dobles enlaces ([Orskov, 1982](#); [Palmquist, 2007](#); [Orskov, 2012](#); [Millen y col., 2016](#)). Este hecho hace que independientemente del grado de saturación de los ácidos grasos en los alimentos que consumen los rumiantes, los AG procedentes del alimento llegan al intestino delgado mayoritariamente saturados. Por ello, los AG que se absorben en el intestino son predominantemente saturados. En menor cantidad pueden llegar algunos AG de origen microbiano (que no se encuentran normalmente en los alimentos de origen vegetal; p. ej., AG de cadena ramificada) ([Vlaeminck y col., 2006](#)), o AG insaturados que son intermediarios en el proceso de

hidrogenación ruminal que se forman como consecuencia de una saturación incompleta de los AG de los lípidos del alimento.

2.1.1.3 Formación de C18:2 c9t11 como consecuencia de la hidrogenación ruminal de ácidos grasos

Las primeras investigaciones señalaban que el origen del C18:2 c9t11 de la leche era la biohidrogenación incompleta del C18:2 c9c12 de origen alimentario en el rumen ([Kepler y col., 1966](#)). Posteriormente se demostró que también podía proceder de la síntesis endógena en la glándula mamaria ([Corl y col., 2001](#)).

Tras la hidrólisis, los ácidos grasos no esterificados son hidrogenados (saturación de dobles enlaces) por la acción de diversas enzimas (isomerasas y reductasas) microbianas. Entre las bacterias ruminales responsables de la biohidrogenación de los ácidos grasos, *Butyrivibrio fibrisolvens* representaría un papel relevante ([Kepler y Tove, 1967](#); [Fukuda y col., 2006](#); [Wallace y col., 2006](#)), aunque se sabe que otras bacterias, tales como *Ruminococcus*, *Eubacterium* o *Fusocillus*, también pueden estar implicadas ([Palmquist y col., 2005](#); [Wallace y col., 2006](#)). Algunas bacterias que pueden encontrarse en el rumen o en otros medios, tales como *Propionibacterium* y bacterias lácticas, también pueden hidrogenar parcialmente los ácidos linoleico y linolénico ([Gorissen y col., 2015](#); [Hur y col., 2017](#)). El *Butyrivibrio proteoclasticus* tienen capacidad para convertir C18:2 c9t11 en C18:0 ([Maia y col., 2007](#)), mientras que otras bacterias a partir de partir del C18:2 c9t11 solo pueden llegar a producir C18:1 t11 ([Bauman y Griinari, 2001](#); [Shingfield y Griinari, 2007](#); [Ventto y col., 2017](#)). El proceso de biohidrogenación no deja de ser un mecanismo de defensa de los microorganismos ruminales para reducir la toxicidad de los ácidos grasos insaturados ([Enjalbert y col., 2017](#)). Los ácidos grasos de cadena larga inhiben el metabolismo microbiano, y esta actividad inhibitoria es mayor cuanto mayor es su grado de insaturación. El proceso de hidrogenación de los AG se inicia con una primera isomerización, que consiste en que la forma geométrica *cis* de los dobles enlaces se transforma en la forma *trans* de dicho enlace (más estable en el rumen). De este modo, el doble enlace en posición 12 del C18:2 c9c12 es transferido con configuración *trans* al carbono 11 para dar lugar a C18:2 c9t11 ([Fellner y col., 1995](#); [Palmquist y col., 2005](#)). A continuación, tiene lugar una hidrogenación progresiva de los dobles enlaces hasta saturar completamente los

ácidos grasos ([Harfoot y Hazlewood, 1997](#)). Para ello, inicialmente se produce una rápida hidrogenación del enlace *cis*-9 para formar ácido vaccénico (C18:1 *t*11) y, posteriormente, una segunda hidrogenación en el enlace *trans*-11 para dar lugar finalmente a ácido esteárico (C18:0). Por lo tanto, el C18:2 *c*9*t*11 junto a diferentes ácidos grasos *trans* monoinsaturados, fundamentalmente el C18:1 *t*11, serían los intermediarios más destacados de este proceso de hidrogenación ([Palmquist y col., 2005](#)).

En función de diversos factores, la hidrogenación ruminal podría quedar incompleta, dando lugar a un flujo al duodeno de ácidos grasos insaturados y determinados metabolitos intermedios ([Stanton y col., 2003](#)) que podrían llegar a absorberse en el intestino y aparecer en los productos finales (leche y carne). La gran estabilidad que posee la configuración del enlace *trans*-11 hace que la última reacción sea la etapa limitante dentro del proceso de biohidrogenación, lo cual podría redundar en un aumento de la cantidad de C18:1 *t*11 en la digesta que pasa del rumen al abomaso y, posteriormente, al intestino.

Cuando se cultiva *B. fibrisolvens* en presencia de ácido α -linolénico (C18:3 *c*9*c*12*c*15) como sustrato también se produce C18:1 *t*11 pero a partir de C18:3 *c*9*t*11*c*15 ([Khanal y Dhiman, 2004](#)) y C18:2 *t*11*c*15 ([Loor y col., 2002](#); [Loor y col., 2004](#)). Cuando se suplementan las dietas de ganado vacuno con grasas ricas en ácido oleico también se ha observado incrementos en los niveles de C18:2 *c*9*t*11 ([Secchiari y col., 2003](#); [Collomb y col., 2004](#)), si bien estos aumentos son menos importantes que cuando se utilizan aceites vegetales ricos en ácidos grasos poliinsaturados.

A pesar de haber sido objeto de numerosas investigaciones en las últimas décadas, aún se desconocen numerosos aspectos relacionados con los microorganismos y las enzimas involucradas en el proceso, así como con la identificación de los compuestos intermediarios que se forman ([Jenkins y col., 2008](#)).

2.1.2 Síntesis endógena de C18:2 *c*9*t*11 en la glándula mamaria

Aunque la formación de C18:2 *c*9*t*11 a partir de ácido linoleico en el rumen no tiene discusión, los contenidos de este ácido en la grasa de leche no se justificaban únicamente por su producción mediante esta vía. A partir de

observaciones previas que describían desaturaciones de monoenos *trans* a dienos *cis-trans* C18:2 en el tejido mamario, [Griinari y Bauman \(1999\)](#) postularon que el C18:2 c9t11 podría ser sintetizado endógenamente a partir de C18:1 t11 por medio de la enzima Δ -9 desaturasa. Esta enzima se encuentra activa en la glándula mamaria. El incremento observado en los niveles de C18:2 c9t11 en la grasa láctea (dos tercios o más sobre el contenido original) tras la adición postruminal de C18:1 t11 confirmó la importancia decisiva de la síntesis endógena ([Griinari y col., 2000](#)) en el ganado vacuno.

También se ha demostrado el origen endógeno del isómero C18:2 t7c9, y quizás haya otros isómeros de este origen, pero todo parece indicar que su contenido en la grasa de leche de vaca es muy pequeño y su significado biológico aún no ha sido clarificado. El C18:2 t7c9 es cuantitativamente el segundo isómero más importante, constituyendo entre el 3 y el 15 % del total de los isómeros conjugados de ALC en grasa de origen lácteo. [Corl y col. \(2002\)](#) sugirieron que era sintetizado casi exclusivamente en la glándula mamaria por medio de la Δ -9 desaturasa a partir del C18:1 t7 producido en el rumen por isomerización del ácido oleico. La presencia de otras moléculas *trans* C18:1 en leche y líquido ruminal permite deducir la existencia de otras actividades enzimáticas *cis trans* isomerasas en las bacterias del rumen, que contribuirían a la formación de niveles muy bajos de otros isómeros conjugados de ALC presentes en la leche, tales como el C18:2 t10c12 ([Baumgard y col., 2000](#); [Piperova y col., 2002](#)).

2.1.3 Factores determinantes de la producción del C18:2 c9t11

Los ácidos grasos de la leche tienen un doble origen: (1) aproximadamente un 60 % de los ácidos grasos secretados en la leche son incorporados a partir de los ácidos grasos transportados por lipoproteínas plasmáticas, y que proceden de la absorción intestinal o de la movilización de reservas grasas y llegan a la glándula mamaria o (2) son sintetizados *de novo* en la glándula mamaria a partir de acetato y de 3-hydroxibutirato. Los ácidos grasos sintetizados *de novo* alcanzan un tamaño de hasta 16 carbonos ([Chilliard y Ferlay, 2004](#)) y por tanto la presencia de C18:1 t11 y ALC en la leche va a depender, fundamentalmente, del tipo y cantidad de ácidos grasos que se absorben en el intestino. Los AG que llegan al intestino dependen, a su vez, de los que estén contenidos en el alimento

consumido por el animal, y de las transformaciones de los mismos que se produzcan en el rumen. Además, hay factores no nutricionales que inciden sobre su concentración.

2.1.3.1 Factores no nutricionales

Entre las distintas especies, es la leche de oveja la que presenta los contenidos más altos de C18:2 c9t11 (como media más del 1 % del total de los ácidos grasos) seguida de la de vaca y cabra ([Jahreis y col., 1999](#); [Tsiplakou y col., 2009](#); [Serafeimidou y col., 2013](#)).

También se han observado diferencias entre razas de cabras en relación con el perfil de ácidos grasos, en particular entre razas de aptitud cárnica y razas lecheras ([Horcada y col., 2012](#)). En el caso de las ovejas, se han observado solo pequeñas diferencias entre razas en el perfil de ácidos grasos en la leche ([Tsiplakou y col., 2008](#)). Aunque se reconoce un posible efecto de la raza sobre dicho perfil de ácidos grasos, se ha concluido que el efecto de dieta es más determinante ([Tsiplakou y col., 2006](#)).

De igual forma, el perfil de ácidos grasos en la leche de ovejas varía en función de la fase de lactación. Se ha observado que en el último tercio de la lactación el perfil de ácidos grasos de la leche es más beneficioso para la salud humana que el de la leche producida en el primero o segundo tercio. Las diferencias entre razas se hacen más evidentes al comparar perfiles de ácidos grasos lácteos correspondientes a la misma fase de la lactación ([Sinanoglou y col., 2015](#)).

El efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre el perfil de ácidos grasos varía entre especies. A partir de la relación C18:1 t11/C18:1 t10 en la leche de cabras ([Bernard y col., 2016](#)) o de vacas ([Shingfield y col., 2006](#)) suplementadas con aceite de pescado y aceites vegetales, se ha sugerido que en las cabras predomina la vía de biohidrogenación t11, mientras que en las vacas puede producirse una desviación hacia la vía t10. [Shingfield y col. \(2010\)](#) también planteó que los cambios en la biohidrogenación ruminal ocasionados por la dieta son más relevantes en los bovinos que en las cabras, y sugiere que las ovejas podrían tener un comportamiento más cercano a las últimas. En el mismo sentido [Whitlock y col. \(2002\)](#) observaron que el aumento en la concentración de

C18:2 c9t11 y C18:1 t11 en la leche en respuesta a la suplementación con aceites era mayor en vacas Holstein que en vacas parda alpina. Los efectos de los lípidos en la dieta sobre las poblaciones bacterianas del rumen fueron diferentes en cabras y en ovejas ([Torral y col., 2016](#)).

2.1.3.2 Factores relacionados con la dieta

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga no se sintetizan de *novo* en los tejidos mamario o adiposo de los rumiantes, dadas las limitaciones metabólicas para poder formar dobles enlaces. Por tanto, su concentración en la leche y tejidos animales estaría relacionada con los ácidos grasos que se absorben en el intestino, procedentes del rumen. La cantidad y tipo de ácidos grasos (AG) que se absorben en el intestino delgado va a depender, fundamentalmente, de factores nutricionales que clasificaremos en dos grupos:

- 1) Cantidad y tipo de AG contenidos en el alimento o en grasas y aceites añadidos al alimento para aumentar su concentración energética.
- 2) Factores que afectan a la fermentación microbiana en el rumen y, por tanto, a las transformaciones que se producen en los AG del alimento que llegan a los preestómagos.

2.2 FACTORES NUTRICIONALES RELACIONADOS CON LOS LÍPIDOS DEL ALIMENTO

2.2.1 Consumo de lípidos y grado de insaturación de los AG

La cantidad de AG de cadena larga que llega al intestino delgado varía dependiendo del aporte de AG con el alimento. Dado que tanto el C18:2 c9t11 como el C18:1 t11 son ácidos grasos insaturados de cadena larga, la cantidad de ambos AG que llega al intestino delgado depende en gran medida del consumo de AG poliinsaturados con el alimento ([Chilliard y Ferlay, 2004](#)).

2.2.2 Fuentes de suplementación lipídica

2.2.2.1 Aceites vegetales

La suplementación lipídica de la dieta puede afectar a la cantidad de AG insaturados que llega al intestino, afectando a la hidrólisis de las grasas o a la propia saturación de los AG insaturados libres. Dado que la lipólisis constituye el

primer paso del proceso que conduce a la hidrogenación ruminal, la tasa a la cual ocurre influye de manera determinante sobre la magnitud de la hidrogenación de C18:1 c9, C18:2 c9c12 y C18:3 c9c12c15 presentes en los aceites vegetales (ya que sólo se hidrogenan AG no esterificados) usados en la nutrición de los rumiantes ([Siurana y col., 2018](#)). Así, el uso de anticuerpos que reaccionan de forma específica con las lipasas inhibe la lipólisis y disminuye la biohidrogenación de los AG ([Enjalbert y col., 2017](#)). [Edwards y col. \(2013\)](#) observaron que tanto el grado de insaturación de los AG contenidos en los triglicéridos, como la posición de los dobles enlaces en los AG condicionan la medida en que los triglicéridos son hidrolizados por los microorganismos del rumen, de forma que el aceite de maíz es más resistente a la lipólisis ruminal que los de oliva o lino. En cualquier caso, las diferencias entre aceites de origen vegetal dependen de la especie bacteriana (*A. lipolyticus*, *B. fibrisolvens* o *P. avidum*), ya que cada especie produce unas lipasas u otras ([Edwards y col., 2013](#)).

En relación con la tasa de biohidrogenación de los ácidos grasos poliinsaturados propios de las semillas oleaginosas, el C18:3 c9c12c15 se hidrogena en mayor medida que el C18:2 c9c12 y el C18:1 c9 ([Harvatine y Allen, 2006](#)) y, a su vez, el C18:2 c9c12 también sufre una hidrogenación más intensa que el C18:1 c9 ([Khiaosa-Ard y col., 2009](#)). No obstante, a medida que aumenta el número de dobles enlaces en los ácidos grasos también es mayor su toxicidad sobre las bacterias y que esto puede disminuir su biohidrogenación ([Maia y col., 2010](#)).

La adición de aceites vegetales tiende a reducir la hidrogenación de los ácidos grasos en el rumen, aunque dicho efecto depende en gran medida del contenido en forraje y concentrado del pienso al que se añade el aceite ([Jalc y col., 2007](#); [Khiaosa-Ard y col., 2009](#); [Jalc y col., 2010](#); [Jacob y col., 2012](#); [Szczechowiak y col., 2016](#)). También depende del grado de insaturación de los AG, ya que cuando se añaden aceites con más AG insaturados se reduce la hidrogenación total de ácidos grasos de 18 C ([Li y col., 2015](#); [Wencelová y col., 2015](#)).

En relación con la formación de C18:2 c9t11 y C18:1 t11, dado que son ácidos grasos insaturados de cadena larga que se producen en el rumen a partir de los ácidos grasos insaturados de 18 C ingeridos, la cantidad en que llegan al

intestino depende en gran medida de la cantidad de precursores ingerida ([Chilliard y Ferlay, 2004](#)). En condiciones normales de fermentación ruminal, la producción de C18:1 *t*11 y C18:2 *c*9*t*11 es mayor cuando se adiciona aceite de girasol que cuando se adiciona aceite de linaza o aceite de oliva ([Jalc y col., 2007](#)). Esto debido a que el C18:2 *c*9*c*12 (más abundante en el aceite de girasol) se hidrogena por una vía metabólica en la que se forman C18:2 *c*9*t*11 y C18:1 *t*11 como intermediarios. En el caso del C18:3 *c*9*c*12*c*15, al hidrogenarse se forma C18:1 *t*11, C18:1 *t*15 y C18:1 *t*16 ([Loor y col., 2004](#)), pero apenas se produce C18:2 *c*9*t*11. Y cuando se añade un aceite más rico en C18:1 *c*9 solo se forma C18:1 *t*11 y otros isómeros monoinsaturados ([Mosley y col., 2002](#)). Sin embargo, [Wang y col. \(2003\)](#) no observaron *in vitro* diferencias en la concentración de C18:2 *c*9*t*11 o de C18:1 *t*11 entre dietas suplementadas con aceite de girasol o con aceite de lino. También hay discrepancias entre métodos. Así, con la adición de aceite de girasol en experimentos *in vitro* de corta duración se apreció una disminución de C18:0 y un aumento de la producción de C18:1 *t*11 y C18:2 *c*9*t*11; sin embargo, estos resultados no se observaron en los experimentos *in sacco* ([Wencelová y col., 2015](#)). También se ha observado que el efecto de la adición de lípidos sobre el nivel de C18:2 *c*9*t*11 puede ser transitorio y disminuir al cabo de dos semanas tras el inicio de la suplementación ([Bauman y col., 2000](#); [Ferlay y col., 2003](#)).

En la mayoría de los estudios realizados se ha observado un aumento del contenido en C18:2 *c*9*t*11 en la leche y la carne al emplear dietas que aportan lípidos ricos en ácidos grasos insaturados. La comparación entre diferentes tipos de aceites de origen vegetal sugiere que aquellos con contenidos más altos en los ácidos linoleico y α -linolénico (tales como los procedentes de semillas de soja, algodón, girasol, lino, cártamo y colza) son los que dan lugar a un mayor aumento del contenido de C18:2 *c*9*t*11 en la carne ([Vahmani y col., 2015](#)) y la leche ([Luna y col., 2004](#)). Además, se ha comprobado que aquellos más ricos en ácido linoleico (girasol, soja) son los más efectivos ([Kelly y col., 1998](#); [Dhiman y col., 2000](#); [Lock y Garnsworthy, 2002](#); [Collomb y col., 2004](#); [Hervás y col., 2006](#); [Shingfield y col., 2006](#)), porque la suplementación con ácido linoleico favorece la formación de C18:2 *c*9*t*11 tanto en el rumen como en la glándula mamaria. La adición de aceite de girasol a dietas con alto contenido en concentrados también

da lugar a la formación de AG insaturados que provocan un descenso en el contenido graso de la leche (Ventto y col., 2017). Por su parte, el α -linolénico únicamente contribuye a incrementar los niveles de C18:2 c9t11 por vía endógena a partir del C18:1 t11 ([Jenkins y col., 2008](#)). Asimismo, la suplementación de la dieta con aceite de linaza, rico en C18:3 c9c12c15, determina un aumento en la grasa de la leche principalmente de C18:3 c9t11c15, C18:2 t11c15 y C18:1 t11, pero también en menor escala la de C18:3 t9t11c15, C18:3 t10c12c15, C18:2 t10c15 y C18:1 t10 ([Gómez-Cortés y col., 2017](#)) y de C18:1 t13 y C18:2 c9t11 ([Saliba y col., 2014](#)).

Las diferentes especies de bacterias que participan en la biohidrogenación de C18:1 c9, C18:2 c9c12 y C18:3 c9c12c15 utilizan preferentemente determinados sustratos y generan productos específicos. Así, *B. fibrisolvens* tiene la capacidad de convertir C18:2 c9t11 y C18:2 t9t11 en C18:1 t11, y también metaboliza C18:2 t10c12 a C18:1 t10 y pequeñas cantidades de C18:1 t12 y C18:1 c12. Sin embargo, el *B. proteoclasticus* no crece en presencia de C18:2 c9t11 o de C18:2 t10c12; pero sí puede proliferar en un medio enriquecido con C18:2 t9t11 formando C18:0 ([McKain y col., 2010](#)).

2.2.2.2 Aceites de origen marino: extraídos de pescado o de algas

El aceite de pescado tiene un alto contenido en ácido eicosapentanoico (C20:5n3) y ácido docosahexaenoico (C22:6n3) (en torno a 15 y 12 %, respectivamente) ([Kairenius y col., 2018](#)), y el aceite de algas es rico en C22:6n3 (hasta un 24 %) ([Vahmani y col., 2013](#)). Estos ácidos grasos se han usado para modificar la biohidrogenación ruminal y mejorar el perfil de ácidos grasos en la carne y la leche y son efectivos para incrementar la concentración de C18:1 t11 y C18:2 c9t11 en la leche ([Chilliard y col., 2007](#)).

A nivel ruminal, se ha observado que la adición de aceite de pescado puede no tener un efecto negativo sobre la lipólisis o biohidrogenación aparente del C18:2 c9c12 y el C18:3 c9c12c15; pero si puede inhibir la saturación completa de estos ácidos, por lo cual aumenta la concentración de C18:2 t11c15 y C18:1 t11 ([Chow y col., 2004](#)). También se ha determinado *in vivo* un aumento del flujo de C18:1 t11 que llega al intestino como consecuencia de la adición de aceite de pescado a la dieta; que puede acompañarse de un incremento de otros AG *trans* C18:1 ([Shingfield y col., 2012](#)). Este efecto fue mayor cuando el aceite de

pescado se añadió a una dieta suplementada con aceite de linaza, pero no cuando la dieta estaba suplementada con aceite de girasol ([Shingfield y col., 2012](#); [Toral y col., 2016](#); [Kairenius y col., 2018](#)). Los AG poliinsaturados del aceite de pescado inhiben la saturación de C18:1 *t*11 a C18:0 e inducen la formación de isómeros C18:1 *t*10 ([Toral y col., 2017](#)). Al incluir ingredientes en el pienso con los que se aumenta su contenido en almidón aumenta la formación en el rumen de compuestos intermediarios de la hidrogenación de los AG C18: *t*10 y C18:2 *t*10c12 relacionados con la depresión de grasa en la leche (Lascano y col., 2016). La biohidrogenación de los AG disminuye como consecuencia de la suplementación con aceite de pescado, en mayor medida al aumentar el nivel de inclusión de dicho aceite ([AbuGhazaleh y Ishlak, 2014](#)). De igual forma, la adición de cantidades crecientes de algas a la dieta puede provocar una disminución de la lipólisis y reduce significativamente la hidrogenación completa de los AG que da lugar a la formación de C18:0 ([Boeckert y col., 2007](#)). La respuesta en la hidrogenación ruminal a la adición de algas es dependiente del nivel de adición, y provoca un descenso en la producción de C18:0 y una acumulación de isómeros *trans* de C18:1 y C18:2, pero no afecta a la proporción de C18:1 *t*10 ni a la abundancia de las principales especies bacterianas implicadas en la saturación de los AG ([Zhu y col., 2016](#); [Dewanckele y col., 2018](#)). Sin embargo, algunos autores han observado un efecto significativo de la adición de suplementos de origen ficológico sobre la microbiota del rumen, reduciendo significativamente la abundancia de especies del género *Butyrivibrio* ([Boeckert y col., 2008b](#); [Toral y col., 2012](#); [Lv y col., 2016](#)).

La suplementación con aceites de pescado (solo o en combinación con aceites vegetales) aumenta la formación de isómeros con uno o más dobles enlaces *trans* ([Kairenius y col., 2018](#)). El aceite de pescado incubado en líquido ruminal *in vitro* aumenta la concentración de C18:1 *t*11 como consecuencia de que el C22:6n3 puede inhibir la enzima reductasa de los microorganismos que es responsable de la hidrogenación terminal del C18:1 *t*11 a C18:0 ([AbuGhazaleh y Jenkins, 2004](#); [Shingfield y col., 2012](#); [Szczecowiak y col., 2016](#)). Esto también se ha documentado tanto *in vivo* ([Toral y col., 2014](#); [Cieślak y col., 2015](#)) como *in vitro* ([Li y col., 2015](#); [Szczecowiak y col., 2016](#)). Otros AG del aceite de pescado (C20:3n3 y C22:3n3) no parecen afectar la concentración de C18:1 *t*11

([AbuGhazaleh y col., 2006](#)). En estudios con el RUSITEC también se ha observado que si el aceite de pescado y el aceite de girasol se aportan previa nanoemulsificación disminuye la biohidrogenación y la producción de C18:2 c9t11 y C18:1 t11 en el rumen ([El-Sherbiny y col., 2016](#)).

La combinación de aceites de pescado y vegetales normalmente resulta en mayores incrementos de C18:2 c9t11 en la leche ([AbuGhazaleh, 2008](#)). No obstante, no siempre se ha observado un efecto significativo de la suplementación de las dietas con aceite de pescado y aceite de algas sobre la concentración de C18:2 c9t11 y C18:1 t11 en la leche ([Vahmani y col., 2013](#)) y dicho efecto se ha asociado a la suplementación simultánea con aceites ricos en ácido linoleico ([AbuGhazaleh y col., 2007](#); [AbuGhazaleh, 2008](#); [AbuGhazaleh y col., 2009](#)). De igual forma, la suplementación con C22:6n3 aumenta las concentraciones de C18:2 c9t11 y C18:1 t11 en la leche, pero también aumenta las de C18:2 t9c11, C18:1 t10 y C22:6n3 ([Boeckert y col., 2008a](#)). En el tejido adiposo la suplementación con C22:6n3 también aumenta el C20:5n3 y disminuye la relación n-6:n-3 ([Meale y col., 2014](#)). Además, se ha observado que la magnitud del aumento en C18:1 t11 y C18:2 c9t11 en la leche como resultado de la suplementación con aceite de pescado puede variar según el perfil de ácidos grasos de dicho aceite ([Toral y col., 2014](#)).

2.2.3 Nivel de incorporación de grasas y aceites

De acuerdo con [Hess y col. \(2008\)](#), el nivel óptimo de incorporación de los lípidos no protegidos en la dieta depende de los objetivos propuestos. En ocasiones es preciso limitar la suplementación con grasa hasta solo un 2 % de la materia seca ingerida para prevenir efectos adversos que podrían observarse en los rumiantes alimentados con dietas ricas en forrajes. Si la suplementación con grasa excede un 4 % de la materia seca se reduciría la digestión en el rumen, especialmente la de la fibra. Sin embargo, los rumiantes alimentados con dietas ricas en alimentos concentrados pueden recibir hasta un 6 % de grasa sin efectos negativos sobre la utilización de otros componentes de la dieta y, en algunas ocasiones, lo mismo sucede con niveles de suplementación de hasta un 10 %. En vacas lecheras se ha estudiado la respuesta a la suplementación de la dieta con aceite de girasol (0, 250, 500 o 750 g/día), apreciándose incrementos lineales en el flujo desde el rumen al abomaso de C18:1 t11 y de C18:2 c9t11 ([Shingfield y](#)

[col., 2008](#)). En el RUSITEC se ha observado que al suplementar el pienso con aceite de girasol o de soja (6 %) se observa un incremento de la formación de C18:2 c9t11, pero también se producen efectos adversos sobre la fermentación y la digestión del sustrato ([Jacob y col., 2012](#))

En el mismo sentido, se ha observado una respuesta lineal en la concentración de C18:1 t11 y C18:2 c9t11 de la leche en respuesta al suministro de sus precursores mediante la adición de aceite a la dieta. [Martinez Marin y col. \(2012\)](#) evaluaron los efectos de la adición de aceites de girasol y de lino (0, 30, 48 y 66 g de aceite/día) a dietas de cabras y observaron un aumento lineal en C18:1 t11 y de C18:2 c9t11. También se ha observado que al incrementar la inclusión de aceite de algas en la dieta (0, 0,8, 1,6 o 2,4 % de la MS) se producen incrementos en la concentración de C18:1 t11 y de C18:2 c9t11 (hasta 7 veces más que el control) en la leche ([Toral y col., 2010](#)).

2.2.4 Efecto de la forma de presentación de los lípidos

La forma de incorporación de estas grasas en la dieta del ganado puede tener una influencia importante. La presentación en forma protegida como sales o el empleo de semillas intactas, sin procesar, apenas produce incrementos en los niveles de C18:2 c9t11 en la leche; mientras que la adición de semillas sometidas a molturación, extrusión, micronización o calentamiento mejora los contenidos de C18:2 c9t11 en la leche, al igual que la adición directa de aceite extraído de las semillas ([Dhiman y col., 2000](#); [Chouinard y col., 2001](#); [Secchiari y col., 2003](#)).

También es posible incrementar el contenido de C18:2 c9t11 mediante la suplementación con isómeros sintéticos de dicho AG en forma de grasa protegida ([Giesy y col., 2002](#); [Perfield y col., 2002](#); [Bernal-Santos y col., 2003](#)), pero dicha alternativa no siempre es viable comercialmente debido al elevado precio de adquisición.

2.2.5 Efectos concurrentes de la adición de lípidos a la dieta

La intervención para manipular el metabolismo de los lípidos en el rumen inevitablemente tiene efectos sobre otros procesos, ya que los microorganismos afectados por dicha manipulación pueden tener diversos roles metabólicos, y la mayoría de las rutas metabólicas de la fermentación microbiana están interrelacionadas, como por ejemplo en la producción, intercambio y utilización de

H₂, que tiene un papel central en la hidrogenación de los AG ([Lourenco y col., 2010](#))

2.2.5.1 Aumento de la concentración energética del pienso y consumo de alimento

La suplementación con grasa tiene valor especialmente en las dietas de vacas lecheras de alta producción. Debido a su alta densidad energética las grasas permiten mayor consumo de energía y una transferencia directa de las grasas del suplemento a la leche. Cuando se utilizan bajos niveles de inclusión de grasas saturadas se puede aumentar el nivel energético de las dietas sin repercusiones negativas sobre el consumo de alimento ([Piantoni y col., 2013](#)) y entonces influye positivamente sobre la producción de leche e incluso sobre la eficiencia de utilización del alimento. Sin embargo, la adición de grasa a dietas con diferente relación forraje:concentrado puede reducir la ingestión de la dieta con mayor proporción de forraje ([Kargar y col., 2010](#)).

2.2.5.2 Reducción de la digestibilidad

La inclusión de grasas en la dieta de rumiantes reduce la digestión de la fibra. [Devendra y Lewis \(1974\)](#) propusieron cuatro mecanismos para explicar este efecto: i) recubrimiento de la fibra con grasa que evita la adherencia microbiana, ii) una modificación de la población de microorganismos ruminales debido a posibles efectos de la grasa sobre ciertos microorganismos, iii) inhibición de la actividad microbiana debido a efectos de los ácidos grasos sobre las membranas celulares y iv) reducción de la disponibilidad de cationes debido a la formación de complejos insolubles con ácidos grasos de cadena larga. En el mismo sentido, [Harfoot y Hazlewood \(1997\)](#) reiteran la importancia de tener en cuenta que, debido al efecto inhibidor de los lípidos sobre el metabolismo microbiano, un aporte de alimentos con elevado contenido en grasa puede provocar una inhibición de la fermentación ruminal, disminuyendo significativamente la digestibilidad del alimento. [Jenkins \(1993\)](#) considera que la adición de lípidos a la dieta de los rumiantes puede afectar a la fermentación ruminal, provocando una reducción de la digestibilidad de hidratos de carbono. La digestibilidad de los carbohidratos estructurales puede disminuir hasta un 50 % o más debido a la adición de un 10 % de grasa.

Adicionalmente, el tipo de grasa también influye sobre la digestibilidad del alimento, ya que las grasas insaturadas son más tóxicas para las bacterias del rumen que las grasas saturadas ([Palmquist y Jenkins, 1980](#)).

Como se mencionó anteriormente este efecto negativo de la adición de lípidos sobre la digestibilidad depende del nivel de adición a la dieta y se ha determinado que dicho nivel no debe sobrepasar un máximo de un 6 % ([Hess y col., 2008](#)).

2.2.5.3 Acción de los lípidos sobre los microorganismos

Algunos microorganismos ruminales son muy sensibles a la suplementación de la dieta con ácidos grasos insaturados, particularmente al suministro de ácido linolénico. [Yang y col. \(2009\)](#) mostraron que el aceite de lino (4 %) disminuyó de manera sensible los recuentos de *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens* en el líquido ruminal. El recuento de *Ruminococcus albus* disminuyó como resultado de la adición de cualquier aceite (soja, lino o su mezcla).

[Belenguer y col. \(2010\)](#) observaron que la suplementación con aceite de girasol y aceite de pescado induce cambios importantes en la población bacteriana y, en particular, en las comunidades de *Butyrivibrio*. Además, también observaron que la suplementación con lípidos tiene un efecto variable sobre diferentes bacterias de la familia *Lachnospiraceae*, que incluye bacterias cultivadas conocidas por su actividad en el proceso de biohidrogenación ruminal.

La suplementación con aceite de pescado provoca cambios en la concentración de ADN de *Anaerovibrio lipolyticus*, *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens*. La dieta basal (pasto o ensilaje de trébol) también afectó a la abundancia relativa de *A. lipolyticus*, *B. proteoclasticus*, *F. succinogenes*, *R. albus* y *R. flavefaciens* ([Huws y col., 2010](#)). Adicionalmente, la suplementación con aceite de pescado y aceite de soja resultó en una disminución de la abundancia de *R. flavefaciens*, *B. fibrisolvens* y *R. albus* ([Gudla y col., 2012a](#)). La suplementación con aceite de pescado (4,5 % de la MS) disminuyó la concentración de ADN de *B. fibrisolvens* y *R. albus* ([Potu y col., 2011](#))

2.2.5.4 Reducción en la producción de metano

El metano es un gas con efecto invernadero, cuyo efecto es potencialmente 21 veces mayor que el del dióxido de carbono ([Solomon, 2007](#)). A la producción agrícola se le atribuye un 40 % de la emisión total de metano derivada de actividades antropogénicas. La producción de metano procedente de la ganadería constituye entre un 15 y un 20 % de la producción total de gases con efecto invernadero de origen antrópico ([Lassey y col., 1997](#); [Moss y col., 2000](#); [Scheehle y Kruger, 2006](#)). Además, la producción ruminal de metano constituye una pérdida de entre un 6 y un 8 % de la energía bruta consumida. Dicha pérdida puede incluso llegar hasta un 12 % de la energía ingerida ([Johnson y Johnson, 1995](#)).

El metano se forma en el rumen por la acción de los microorganismos metanogénicos, un subgrupo de las Archaea. En el proceso de digestión ruminal, los hidratos de carbono son degradados por los microorganismos y fermentados principalmente a ácidos grasos volátiles (AGV) y gases de fermentación (hidrógeno (H_2) y CO_2). Las arqueas metanogénicas usan autotróficamente el H_2 para reducir CO_2 a CH_4 en una serie de reacciones que están acopladas a la síntesis de ATP ([Leahy y col., 2010](#)).

2.2.5.4.1 Uso de grasas para reducir la formación de metano en el rumen

La suplementación con grasas es una de las alternativas más efectivas para disminuir las emisiones de metano ([Beauchemin y col., 2009](#)). La suplementación con grasas también puede mejorar las concentraciones de C18:2 c9t11 en leche y carne y a su vez promover un mejor estatus energético, sobre todo en vacas de alta producción ([Coppock y Wilks, 1991](#)).

La adición de lípidos a la dieta puede reducir las emisiones de metano ([Broucek, 2018](#)), siendo este efecto más acusado cuando se usan aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados ([Beauchemin y col., 2007](#); [Hristov y col., 2013](#)). En términos generales, los lípidos pueden reducir la formación de metano en el rumen al disminuir la cantidad de materia orgánica fermentada en el rumen, la actividad de las arqueas metanogénicas y el número de protozoos, y a través del uso de hidrógeno para el proceso de biohidrogenación de los AG (reduciendo su disponibilidad para la metanogénesis) ([Johnson y Johnson, 1995](#)). Así, se ha observado una disminución de la producción de metano ruminal en respuesta a la

adición a la dieta de los ácidos grasos de 18 C oleico, linoleico y linolénico ([Jalc y col., 2007](#)). También se ha observado que la suplementación con sebo, aceite de girasol o semillas de girasol es igualmente efectiva para reducir el metano ([Beauchemin y col., 2007](#)). La adición de aceite de linaza (8 %) disminuyó la producción de metano; pero la adición de una misma cantidad de aceite de girasol no tuvo efecto; aunque en ambos casos disminuyó la población de metanógenos ([Castagnino y col., 2015](#)).

Se considera que los ácidos grasos de la dieta, principalmente los poliinsaturados, constituyen una alternativa para reducir la metanogénesis ruminal ([Martin y col., 2007](#)). En vacas lecheras se ha comprobado que la suplementación con ácidos grasos del lino reduce la metanogénesis ruminal ([Martin y col., 2008](#)). La reducción de metano inducida por la adición de grasa a la dieta puede alcanzar hasta un 50 % ([Machmüller y col., 1998](#)) y se ha observado que está asociada a la disminución de protozoos ([Cieslak y col., 2006](#)). También se ha observado que la depresión en la producción de metano está directamente relacionada con el grado de insaturación de los ácidos grasos de 18 C y con la longitud de la cadena de los AG, ya que el efecto es mayor con ácidos grasos de más de 20 carbonos ([Giger-Reverdin y col., 2003](#)).

Algunos estudios han observado reducciones substanciales (80 %) en la producción de metano a través de la suplementación de aceites, especialmente ricos en AG poliinsaturados ([Fievez y col., 2003](#)) y o de cadena media ($\leq C14$) y de cadena larga ($>C14$), con los cuales se alcanzaron reducciones de un 50 % en la producción de metano con niveles de inclusión del 3 % de la materia seca ([Machmüller, 2006](#)).

También se han utilizado aceites de linaza ([Martin y col., 2008](#)), coco, colza ([Beauchemin y McGinn, 2006](#)), girasol ([McGinn y col., 2004](#); [Raposo y col., 2008](#)) y aceites de pescado ([Fievez y col., 2003](#)). La suplementación con ácidos grasos de lino y girasol puede deprimir la metanogénesis ruminal, sin embargo también reduce la producción de leche ([Martin y col., 2006b](#)). El aceite de coco y el aceite de pescado, ricos en ácidos grasos de cadena media y larga, pueden mitigar en algo más del 9 % la producción de metano mediante la reducción y reestructuración de las comunidades de microorganismos en el rumen ([Patra y Yu, 2013](#)). Sin embargo, otras investigaciones indican que la infusión de aceites al

rumen en concentraciones inferiores al 5 % no afectan la producción de metano ([Cosgrove y col., 2008](#)).

La suplementación con semillas molidas de girasol, semilla de lino triturado y semilla triturada de colza en concentraciones del 3,1 al 4,2 % de la materia seca total ingerida disminuyeron la producción de metano en un 14 %; registrándose un mayor descenso por unidad de materia seca ingerida mediante la suplementación con semillas de lino (18 %), seguido por las semillas de colza (16 %) y finalmente por el girasol (10 %). La administración de girasol y colza produjo una disminución del número de protozoos ruminales ([Beauchemin y col., 2009](#)).

En otros estudios ([Ungerfeld y col., 2005](#)) se evaluaron las propiedades antimetanogénicas potenciales de un ácido hexadecatrienoico altamente insaturado, aislado del alga *Chaetoceros* y se observó que éste disminuía la producción de metano hasta en un 97 %, pero también provocaba una reducción en la actividad de fermentación y una acumulación de hidrógeno en el rumen. Estos mismos autores estudiaron el efecto del aceite de oliva, como uno de los aceites más importantes producidos en la industria, pero éste no afectó a la producción de metano.

El suministro de aceite de girasol (5 % de MS) disminuyó las emisiones de metano en un 22 % en comparación con el control; sin embargo, el aceite redujo la digestibilidad total de la fibra en un 20 % ([McGinn y col., 2004](#)).

2.2.5.4.2 Otras estrategias nutricionales para reducir la formación de metano en el rumen

Para mitigar la producción de metano en el rumen se ha recurrido a otras estrategias, tales como la adición de antibióticos ionóforos, el uso de forrajes de alta calidad o el aumento de la proporción de alimentos concentrados en la ración. Estas alternativas nutricionales reducen la emisión de metano a través de cambios en la fermentación ruminal, inhibición directa de los metanogénicos y protozoos, o retirando los iones de hidrógeno del proceso metanogénico ([Boadi y col., 2004](#)). La defaunación ruminal (supresión de la población de protozoos) reduce la metanogénesis ruminal ([Cheeke, 2000](#); [Hess y col., 2003](#); [Holtshausen y col., 2009](#)) porque cerca del 25 % de las arqueas metanogénicas ruminales viven asociadas a los protozoos ([Newbold y col., 1997](#)). Sin embargo, la mayoría

de estrategias desarrolladas para provocar la defaunación sólo han conseguido un éxito muy limitado ([McAllister y Newbold, 2008](#)).

2.3 FACTORES NUTRICIONALES RELACIONADOS CON LA FERMENTACIÓN RUMINAL

La lipólisis y la hidrogenación de los AG son procesos de fermentación ruminal y, por ello, cualquier factor que afecte a dicha fermentación puede tener un efecto, asimismo, sobre los procesos de transformación de los AG del alimento en el rumen. Podría afirmarse que la fermentación microbiana es óptima cuando se mejora la eficiencia de síntesis y el crecimiento microbianos. Por ello, dentro de este grupo de factores se incluyen todos aquellos, de carácter nutricional, que puedan afectar a la estructura, crecimiento o actividad metabólica de la microbiota ruminal, o a los procesos mismos de fermentación microbiana.

Entre los factores que afectan de forma general a la fermentación ruminal cabe mencionar los siguientes:

- Nivel de ingestión.
- Las proporciones de forraje y concentrado en el pienso.
- El tipo de alimento concentrado (rico en almidón, o en fibra soluble o en proteína).
- Contenido en grasa del pienso (efectos ya descritos en la sección anterior).
- El tipo de forraje (gramínea o leguminosa) y el contenido y composición de la fibra (estructura de la pared celular vegetal).
- Método de conservación de los forrajes y contenido en humedad del pienso.
- La forma física del pienso (molienda, granulado, picado de forraje, tamaño de partícula).
- Manejo de la alimentación (uso de raciones mixtas, pastoreo, frecuencia de alimentación, número de comidas diarias, etc.).

Dado que estos factores pueden tener una influencia sobre el metabolismo de los lípidos y las transformaciones de los AG en el rumen, pueden afectar

también al flujo de C18:2 *c9t11* y C18:1 *t11* hacia el duodeno y, finalmente, a su concentración en la leche.

De estos factores el que puede ser considerado más importante y que ha recibido una mayor atención por la comunidad científica sería la proporción de forraje y concentrado en el pienso. Estrechamente asociado a dicho factor, debe destacarse el pH en el rumen. Ambos factores están estrechamente relacionados ya que un mayor consumo de alimentos concentrados provoca un descenso del pH en el rumen, y a medida que el pH es más ácido se reduce la digestión de los forrajes y predomina únicamente la de los alimentos concentrados. Ambos factores provocan cambios sustanciales en las comunidades microbianas del rumen, sin que haya sido posible elucidar completamente si dichos cambios se deben únicamente a uno u otro factor ([Calsamiglia y col., 2012](#)). Por este motivo, ambos factores serán considerados conjuntamente, describiendo brevemente sus efectos sobre el metabolismo de los lípidos en el rumen, la población microbiana y los procesos de fermentación.

2.3.1 Efecto del consumo de alimentos concentrados y del pH ruminal sobre el metabolismo de los lípidos en el rumen

2.3.1.1 Composición de la dieta (relación forraje:concentrado) y metabolismo lipídico en el rumen

Las dietas ricas en cereales pueden alterar las transformaciones de los ácidos grasos en el rumen. En vacas lecheras se ha observado que al ser alimentadas con una dieta rica en concentrado disminuye la hidrogenación de C18:2 *c9c12* y de C18:3 *c9c12c15* en el rumen ([Loor y col., 2004](#)). [Latham y col. \(1972\)](#) ya habían observado que cuando se reduce la proporción de forraje en la dieta disminuye el número de bacterias del género *Butyrivibrio*, lo que reduciría también la actividad lipolítica y la hidrogenación del ácido linoleico y linolénico en el rumen ([Maia y col., 2010](#); [Shingfield y col., 2012](#)). También se ha observado que raciones con una alta proporción de cereales pueden limitar la lipólisis ([Palmquist y Schanbacher, 1991](#)), que en este tipo de dietas la lipólisis es llevada a cabo principalmente por *Anaerovibrio lipolyticus*, bacteria muy sensible a la disminución del pH que se produce cuando se fermentan a dietas con alta proporción de concentrado ([Van Nevel y Demeyer, 1996](#)). Aunque en algunos

experimentos *in vitro* de corta duración (2 h) se ha observado que al incrementar la proporción de carbohidratos rápidamente fermentables en la dieta aumentaron las tasas de lipólisis y de biohidrogenación; en experimentos de más larga duración (*in sacco*) se concluyó que el reemplazo de fibra por almidón causa una reducción de dichas tasas ([Gerson y col., 1985](#)). La actividad de biohidrogenación de AG es mayor en bacterias ruminales obtenidas de animales alimentados con dietas ricas en concentrados que en las de animales alimentados con dietas ricas en forraje ([Choi y col., 2005](#)).

Un mayor consumo de alimentos concentrados, reduciéndose el consumo de alimentos fibrosos, puede reducir la biohidrogenación completa de los AG e incrementar el flujo de *trans* C18:1 hacia el intestino delgado. Independientemente de los cambios en pH ruminal, la fermentación de alimentos concentrados en el rumen puede inducir un cambio en la conversión de C18:1 *t*11, el intermediario *trans* C18:1 más abundante, a C18:1 *t*10 ([Loor y col., 2004](#))

A medida que se incrementa la proporción de concentrado y, por tanto, el contenido en almidón en el pienso, se produce un cambio en los procesos de hidrogenación de forma que aumenta la formación de isómeros *trans* 10 (relacionados con el descenso del tenor graso de la leche) y disminuye el de isómeros *trans* 11 ([Zened y col., 2013](#); [Ventto y col., 2017](#)). Se ha determinado que la concentración de C18:1 *t*11 y C18:2 *c9t*11 aumenta con una dieta con mayor proporción de forraje; mientras que las concentraciones de C18:1 *t*10 y C18:2 *t*10*c*12 lo hacen en dietas con mayor proporción de concentrado. La relación forraje:concentrado afecta los recuentos de *Anaerovibrio lipolyticus* y *Butyrivibrio* spp.; sin bien la concentración de C18:1 *t*11 en el rumen está más influenciada por la adición de aceite que por la composición de la dieta ([Gudla y col., 2012b](#)). Adicionalmente, se ha observado que la biohidrogenación ruminal es más completa cuando los animales consumieron raciones con heno de hierba, en comparación con raciones en las que el forraje era ensilado de maíz ([Chilliard y Ferlay, 2004](#)). Estas diferencias se atribuyeron a los efectos del tipo de forraje sobre el tamaño de partícula y la forma física del alimento (fibra efectiva), la producción de saliva o el pH en el rumen ([Dang Van y col., 2011](#)). En fermentadores continuos en los que se incubaron piensos suplementados con una mezcla de aceites (pescado y soja), las concentraciones de C18:1 *t*11 y

C18:2 c9t11 fueron mayores con una dieta con 70 % de forraje y 30 % de concentrado, mientras que las concentraciones de C18:1 t10 y C18:2 t10c12 fueron mayores con la dieta con un 30 % de forraje y un 70 % de concentrado. La adición de aceites incrementó la concentración de estos AG insaturados con ambos niveles de forraje ([Gudla y col., 2012a](#); [Gudla y col., 2012b](#)). Por otra parte, el aumento en la concentración de C18:2 t10c12 se presenta como consecuencia de un patrón de fermentación característico para alimentos que contienen una gran cantidad de almidón ([Bauman y Griinari \(2001\)](#) y de la suplementación con aceites ([Bernard y col., 2016](#); [Toral y col., 2016](#)). [Shingfield y col. \(2005\)](#) determinaron que la suplementación con aceite de girasol y pescado produjo mayor concentración de C18:2 c9t11 con una dieta con una elevada proporción de forraje, mientras que, al incrementar la proporción de concentrado, la suplementación lipídica provocaba un aumento en la formación de C18:2 t9c11 y de C18:2 t10c12 en el rumen.

La producción de C18:1 t11 también depende del tipo de cereal incluido en el pienso. La suplementación con aceite de pescado de piensos formulados con cebada da lugar a una mayor producción de C18:1 t11 y C18:2 c9t11 (pero no la de C18:1 t10) que cuando se suplementan piensos ricos en maíz, lo que sugiere una menor inhibición de la hidrogenación del C18:1 t11 ([Toral y col., 2014](#)). El tipo de almidón y su velocidad de degradación afecta las poblaciones bacterianas en el rumen y a la síntesis de grasa láctea ([Weimer y col. \(2010\)](#)). Una alta proporción de granos en la dieta puede alterar a la formación de C18:1 t11 y C18:2 c9t11 como consecuencia de la limitación en la lipólisis asociada a una caída del pH ruminal por debajo de 6,0 ([Palmquist y Schanbacher, 1991](#)). No obstante, se ha planteado que aunque, en condiciones normales, la alta proporción de concentrado en la dieta y el bajo pH de la fermentación se presentan de manera simultánea, su efecto sobre la biohidrogenación obedece a mecanismos independientes ([Calsamiglia y col., 2012](#)). También se ha observado que una dieta con una alta proporción en concentrado no necesariamente desencadena una caída en el pH ruminal ([Boeckaert y col., 2008a](#)). [Zened y col. \(2013\)](#) observaron que con dietas con un alto contenido en almidón suplementadas con aceite de girasol (4,7 % de la MS) se incrementó la producción de C18:1 t10 a expensas de C18:1 t11, mientras que con la misma dieta sin aceite la

concentración de C18:1 *t*11 fue mayor, al mismo tiempo que con ambas dietas el pH ruminal fue de 5,7, demostrando que los cambios no dependieron del pH. [Gama y col. \(2008\)](#) no apreciaron diferencias en la concentración de C18:1 *t*10, C18:1 *t*11, C18:2 *t*10*c*12 y C18:2 *c*9*t*11 en la leche cuando las vacas recibían dietas con diferente contenido en fibra suplementadas con aceite de pescado.

Otro factor que puede afectar al metabolismo lipídico en el rumen es el forraje (composición botánica, método de conservación) aportado con la ración ([Adler y col., 2013](#); [Messana y col., 2016](#); [Leduc y col., 2017](#)). Se ha observado que el aumento en C18:2 *c*9*t*11 en la leche en respuesta a la suplementación lipídica fue mayor con una dieta de heno de hierba que con otra de ensilaje de maíz, y que con la suplementación lipídica se incrementa el isómero C18:1 *t*10 en mayor medida cuando el forraje de la dieta es ensilado de maíz o pasto de raigrás verde ([Chilliard y Ferlay, 2004](#)). La leche de animales en pastoreo tiene una mayor contenido en C18:1 *c*9, C18:3 *n*-3 y C18:2 *c*9*t*11 que la de animales alimentados con forrajes conservados ([Chilliard y col., 2007](#); [Elgersma, 2015](#)). [Bernard y col. \(2012\)](#) observaron que con dietas ricas en almidón y suplementadas con aceite de girasol disminuyó la producción láctea de C18:1 *t*11 y C18:2 *c*9*t*11. Adicionalmente, [Palmquist y Jenkins \(2017\)](#) consideran central el hallazgo de [Harfoot y col. \(1974\)](#) acerca de la importancia de la adsorción de los ácidos grasos sobre la superficie de las partículas de alimento y las paredes bacterianas. Se considera que la biohidrogenación ocurre en las grasas adheridas a la superficie de las partículas de alimento y que esto remueve los ácidos grasos del medio y reduce sus efectos inhibitorios sobre los microorganismos, explicando los efectos favorables de la suplementación grasa de dietas altas en forraje.

[Arefaine y Bertilsson \(2017\)](#) concluyeron que la inclusión de al menos un 70 % de forraje en las dietas de los rumiantes mejora la producción de C18:2 *c*9*t*11 y de ácidos grasos poliinsaturados *n*3. Por el contrario, [Jenkins \(1994\)](#) señalan que en dietas ricas concentrados se puede incrementar la absorción de C18:1 *c*9 y de C18:2 *c*9*c*12 que son más abundantes en los granos de cereales.

Aunque la composición de la dieta puede afectar a la formación de unos u otros productos de la biohidrogenación de los AG, ([Khiaosa-ard y col., 2010](#)) observaron que si las dietas ricas en forraje o ricas en concentrado son

isoenergéticas e isoproteicas la tasa de transferencia del C18:2 c9c12 y del C18:3 c9c12c15 de la dieta a la leche es reciproca a su ingestión, de tal manera que aparentemente la transferencia es independiente de la relación forraje:concentrado de la dieta. La concentración de C18:1 t11 en la leche, y en menor medida la concentración de C18:2 c9t11, depende de la suma del consumo de C18:2 c9c12 y de C18:3 c9c12c15. [Mohammed y col. \(2009\)](#) evaluaron la producción de C18:1 t11 y C18:2 c9t11 en la leche de vacas en pastoreo, sin pastoreo o alimentadas con ensilaje de maíz y observaron que las concentraciones fueron mayores en las vacas mantenidas en pastoreo. La importancia de usar dietas isoproteicas en la evaluación de la biohidrogenación se reafirma al constatar que efectivamente las tasas de lipólisis e hidrogenación pueden estar afectadas por el nivel de nitrógeno en la dieta ([Gerson y col., 1983](#)). Además, también se ha observado que el tamaño de la partícula del sustrato incubado puede afectar a las tasas de lipólisis y biohidrogenación *in vitro* ([Gerson y col., 1988](#)).

Con dietas ricas en almidón, se ha evidenciado que la respuesta a la adición de aceites (soja y pescado) fue diferente en estudios con el RUSITEC o en pruebas *in sacco*. En el primer caso se observó un aumento de C18:1 t11, C18:1 c9 y de C18:2 c9c12 y una reducción de la abundancia de *B. fibrisolvens* y *B. proteoclasticus* en la digesta ruminal, pero no se observó efecto sobre C18:0, C18:2 c9t11 ni C18:2 t10c12. Sin embargo, aunque en el rumen de vacas fistuladas también se observó un aumento de la proporción de C18:1 t11, C18:1 c9 y C18:2 c9c12, también aumentó la proporción de C18:2 c9t11 y C18:1 t10, y disminuyó la de C18:0 y de C18:2 t10c12, y no se apreciaron cambios en las poblaciones bacterianas ([Szczechowiak y col., 2016](#)).

[Torral y col. \(2014\)](#) observaron que la suplementación con aceite de pescado (0,8-1,6 % de MS) puede tener un efecto dispar sobre la magnitud de los cambios en las concentraciones de C18:1 t11 y C18:2 c9t11 en leche, probablemente como consecuencia de diferencias en la composición del aceite de pescado

Por último, se ha documentado que en animales con baja y alta ganancia de peso que consumen una misma dieta (alta en concentrado), se presentan diferencias en la concentración ruminal de algunos AG, tales como el

C18:2 c9c12, el C18:3 c9c12c15 y el c15:0, indicando posibles diferencias en la biohidrogenación ruminal relacionadas con la eficiencia de utilización del alimento ([Artegoitia y col., 2017](#)).

2.3.1.2 Ingestión de alimentos concentrados y efectos sobre el pH ruminal

En condiciones normales, el pH del líquido ruminal está determinado por la cantidad de ácidos orgánicos producidos, que depende de la cantidad de alimento ingerido y de la tasa y extensión de su degradación en el rumen. Estos ácidos orgánicos liberan protones que pueden disminuir el pH del contenido ruminal. La cantidad de saliva producida durante la masticación del alimento y, sobre todo, durante la rumia, determina, por su contenido en sales minerales, la capacidad amortiguadora del pH en el rumen, ya que dichas sales pueden neutralizar los ácidos producidos durante la fermentación. La cantidad de saliva depende del tiempo y ritmo de ingestión y rumia, que son influenciados por la proporción de forraje, el tamaño de la partícula y la humedad del alimento, pero también por otros factores relacionados con el comportamiento alimentario del animal. La distribución del consumo de alimento a lo largo del día (número y frecuencia de comidas) puede tener una influencia sobre el balance ácido-base en el rumen ([González y col., 2012](#)). La producción de saliva es muy importante para la función ruminal porque tiene capacidad amortiguadora del pH como resultado de su elevada concentración en bicarbonato y fosfato. La producción de saliva durante la ingestión de alimento y la rumia contribuye a neutralizar cerca de 30 % de los ácidos producidos diariamente. Otro mecanismo de regulación del pH ruminal es la eliminación de los ácidos mediante la absorción a través de la pared ruminal, que retira cerca de 50 % del total de ácidos producidos. Adicionalmente, la digesta que sale del rumen arrastra aproximadamente entre un 15 y un 20 % de los protones producidos durante la fermentación ruminal.

La creciente utilización de alimentos concentrados en la dieta de los rumiantes ha sido determinada por la mayor disponibilidad de cereales y por la necesidad de cubrir las elevadas necesidades nutritivas de los animales de alta producción que no podrían ser satisfechas únicamente con forrajes ([Huffman, 1961](#); [Wangsness y Muller, 1981](#)). Cuando hay un cambio de una dieta con alto contenido en forraje a una dieta en la cual se incrementa el consumo de alimentos concentrados (con un aporte elevado de carbohidratos rápidamente fermentables)

se puede provocar una indigestión aguda con una acusada disminución del consumo de alimento ([Tremere y col., 1968](#)). Como consecuencia de una excesiva ingestión de alimentos concentrados disminuye de forma acusada el pH en el rumen por la rápida fermentación de los carbohidratos no estructurales (almidón y azúcares) que provoca una mayor producción de AGV, y por una menor capacidad de amortiguación del pH ya que se reduce el tiempo de rumia y, consecuentemente, la producción de saliva. Finalmente, se pueden presentar trastornos digestivos y problemas metabólicos y de salud de los rumiantes, tales como acidosis, laminitis, disminución de rendimiento productivo, disminución del contenido graso de la leche y, en algunos casos, muerte ([Kesler y Spahr, 1964](#); [Miller y O'Dell, 1969](#); [Kleen y col., 2003](#)). La incidencia y severidad de estos problemas dependen de múltiples factores, tales como la cantidad y el tipo de forraje, la cantidad y tipo de grano, el tamaño de partícula (fibra efectiva), el tiempo de rumia, la frecuencia y el sistema de alimentación y el uso de aditivos ([Tessmann y col., 1991](#); [Krause y Oetzel, 2006](#); [González y col., 2012](#); [Zebeli y col., 2012](#)).

Estos trastornos digestivos caracterizan el síndrome que se ha denominado acidosis ruminal, ya que uno de los primeros cambios que se observan es la caída de pH en el rumen. En condiciones normales, el pH del rumen se sitúa entre 6 y 7, en un rango de valores ligeramente ácidos que resulta de la producción de ácidos grasos volátiles generados por la fermentación ruminal del alimento. Cuando se presenta una acidosis aguda o clínica, en respuesta a un consumo excesivo de carbohidratos rápidamente fermentables, el pH ruminal disminuye rápidamente a valores comprendidos entre 5 y 4 por una insuficiencia del sistema de amortiguación. Valores de pH por debajo de 5 se consideran el punto de irreversibilidad de la acidosis aguda si el animal continúa consumiendo glúcidos rápidamente fermentables. En este punto se observa una disminución importante de la concentración de AGV en el rumen (40 a 80 %) y una acumulación de ácido láctico ([Martin y col., 2006a](#); [Nagaraja y Titgemeyer, 2007](#)).

En contraste con la acidosis aguda, la acidosis subclínica es un estado difícil de caracterizar, el rumen está en un estado de desequilibrio transitorio y el pH cae a valores comprendidos entre 5 y 5,6 (hasta 6,0) ([Martin y col., 2006a](#); [Nagaraja y Titgemeyer, 2007](#)) En este estado, puede no haber manifestaciones

clínicas, pero el rendimiento productivo del animal puede verse comprometido. La acidosis ruminal subclínica es uno de los desórdenes metabólicos más importantes en los sistemas intensivos de producción de rumiantes, que puede ser inducido por un incremento en la proporción de concentrado en la dieta así como por la reducción de fibra en la ración ([Colman y col., 2013](#)). [Calsamiglia y col. \(2012\)](#) han propuesto que la acidosis ruminal debe ser atribuida a la combinación de los efectos provocados tanto por un pH ácido como por elevado aporte de concentrado (almidón) con la dieta.

2.3.1.3 pH y metabolismo lipídico en el rumen

La mayor parte de la lipólisis ruminal sería causada por la bacteria *Anaerovibrio lipolyticus*, que es muy sensible al pH del rumen, por lo que en condiciones de acidosis la lipólisis se ve reducida significativamente ([Van Nevel y Demeyer, 1996](#)). La disminución del pH ruminal por debajo de 6 limita la lipólisis y la biohidrogenación de los AG ([Palmquist y Schanbacher, 1991](#)), especialmente del C18:2 c9c12. Las enzimas de las bacterias ruminales involucradas en la lipólisis y la biohidrogenación tienen una actividad óptima a pH comprendidos en un rango entre 7 y 8 ([Enjalbert y col., 2017](#)).

En cultivos continuos, un descenso del pH provocó una reducción de la digestibilidad de la fibra y de la degradabilidad de la proteína, de la concentración total de AGV, de la síntesis de proteína microbiana, de la lipólisis y de la biohidrogenación de los ácidos linoleico y linolénico. En la misma línea, la disminución del pH desde 6,4 hasta 5,6 redujo la población de *Anaerovibrio lipolyticus* y la de bacterias *Butyrivibrio* productoras de ácido vaccénico, y aumentó la de *Butyrivibrio* responsables de la saturación completa de los AG y productoras de ácido esteárico ([Fuentes y col., 2011](#)). Por este motivo, al reducir el pH disminuyó notoriamente la producción de C18:1 t11 y C18:2 c9t11 y aumentó la de C18:1 t10, y C18:2 t10c12. Este estudio también demostró que una disminución del pH ruminal inhibe la biohidrogenación aparente de los AG, y reduce la lipólisis. A un pH bajo los triglicéridos ricos en AG n-6 parecen ser más resistentes a la lipólisis y a la biohidrogenación que los triglicéridos ricos en AG n-3. Al reducir el pH del rumen se inhibe la isomerización de C18:2 c9c12 a C18:2 c9t11 y la reducción completa de C18:1 t11 a C18:0, lo que da lugar a una acumulación de vaccénico ([Troegeler-Meynadier y col., 2006](#)). Con un pH más

bajo la conversión de C18:1 c9 a C18:1 t11 se reduce y aumenta la saturación de C18:1 c9 a C18:0 ([Lee y Jenkins, 2011](#)).

En estudios *in vitro*, se ha observado que con un pH por debajo de 6 disminuye la producción de C18:0 y aumenta la producción de ácidos C18:1 *trans*, al mismo tiempo que se aprecia una mayor abundancia de C18:1 c9, C18:2 c9c12 y C18:3 c9c12c15 sin hidrogenar ([Qiu y col., 2004](#)). En otro experimento *in vitro*, se estableció que el pH afecta al proceso de biohidrogenación de los AG en mayor medida que la proporción de concentrado en la dieta, de forma que al descender el pH aumenta la producción de C18:1 t10 y C18:2 t10c12, mientras que con una dieta alta en concentrado también aumenta el C18:2 t10c12 pero en menor grado ([Fuentes y col., 2009](#)). De igual forma, con pH bajo (5,5 contra 6,4) disminuye la producción de C18:0, C18:1 t11, C18:1 c11, C18:1 c12 y C18:2 c9t11 y aumenta la concentración de C18:1 t10 ([Siurana y col., 2018](#)). [Troegeler-Meynadier y col. \(2014\)](#) confirmaron la menor hidrogenación de C18:2 c9c12 con una menor formación de C18:2 c9t11, así como el incremento en la formación de isómeros *trans*-10 al disminuir el pH. La concentración de C18:2 c9t11 en la digesta ruminal está positivamente correlacionada con el pH ruminal, mientras que la correlación entre C18:2 t10c12 y pH en el rumen fue negativa. En general las bacterias productoras de C18:2 t10c12 pueden ser más tolerantes a la acidez que las productoras de C18:2 c9t11 ([Choi y col., 2005](#)). [Colman y col. \(2010\)](#) analizaron los cambios que se producían en el perfil de ácidos grasos, particularmente de cadena ramificada y con un número impar de carbonos, así como de AG intermediarios de la biohidrogenación, durante la acidosis ruminal subclínica. Los ácidos grasos ramificados y con número impar de carbonos y el C18:1 t10 aumentaron al incrementar la cantidad de concentrado en la ración, mientras que para el C18:1 t11 se observó la tendencia inversa. Las principales diferencias entre el grupo control y el grupo con acidosis se observaron para los AG *iso* C13:0 (menor en el control), *iso* C16:0 (mayor en el control) y C18:2 c9t11 (mayor en el control).

También se ha observado que la adición de aceite puede tener efecto sobre el pH. Así la adición de aceite de girasol a dietas con una alta proporción de concentrados incrementó el pH pero no provocó ese efecto en dietas con mayor proporción de forraje ([Bayat y col., 2017](#)).

2.3.2 Efecto del consumo de alimentos concentrados y del pH ruminal sobre la población microbiana del rumen

El incremento paulatino de la proporción de concentrado en la dieta y el descenso en el pH ruminal ocasionan cambios en la microbiota ruminal que favorecen a los microorganismos productores de lactato, con efectos adversos sobre las bacterias fibrolíticas ([Zebeli y Metzler-Zebeli, 2012](#)). Finalmente, disminuye la capacidad de la mucosa para la absorción y metabolismo de AGV.

En el proceso de adaptación a dietas con hasta un 80 % de alimentos concentrados, se han observado cambios significativos en la abundancia, la diversidad y la estructura de las comunidades bacterianas. Las especies bacterianas más favorecidas por la rápida fermentación de alimentos concentrados y por descensos acusados del pH en el rumen fueron *Proteobacteria*, *Megasphaera elsdenii*, *Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium* y *Prevotella bryantii*. Sin embargo, las especies más fibrolíticas (*Butyrivibrio fibrisolvens* y *Fibrobacter succinogenes*) se ven desfavorecidas cuando se fermentan alimentos concentrados y desciende el pH ruminal. En situaciones de acidosis ruminal dominan especies tales como *S. bovis*, *M. elsdenii*, *Escherichia coli* y *Prevotella albensis* ([Zebeli y Metzler-Zebeli, 2012](#)).

La abundancia de *A. lipolyticus* y *B. fibrisolvens* (subgrupo productor de ácido vaccénico, hidrogenación parcial) fue menor con una dieta baja en forraje, pero no fue afectada por la suplementación con aceites. Sin embargo, la abundancia de *B. proteoclasticus* productor de ácido esteárico (hidrogenación total) no fue afectada por el nivel de forraje ni por la suplementación con aceites ([Gudla y col., 2012b](#)). En el mismo sentido, [Gudla y col. \(2012a\)](#) establecieron que la concentración de C18:1 t11 y C18:2 c9t11 en el rumen fue mayor con una dieta rica en forraje, o cuando se añadía aceite a una ración con una mayor proporción de forraje. La concentración de ADN de *B. fibrisolvens*, *R. albus*, *R. flavefaciens*, *A. lipolyticus* y *B. proteoclasticus* fue mayor con una dieta rica en forraje.

[Maia y col. \(2010\)](#) observaron que el ácido linoleico causa inhibición del crecimiento de *B. fibrisolvens* y *B. proteoclasticus*, y que esta inhibición es exacerbada por el lactato de sodio. [Maia y col. \(2007\)](#) concluyeron que *B. fibrisolvens*, *B. hungatei* y *B. proteoclasticus* son bacterias capaces de utilizar

C18:2 c9c12, sin embargo mientras la primera especie solo llega a producir C18:1 t11, las dos últimas llegan a producir C18:0. Estas tres especies de bacterias también tienen la capacidad para producir ácido butírico. Otra especie productora de ácido butírico: *Clostridium aminophilum* también utiliza el C18:2 c9c12, pero produce C18:1 c9, mientras que *Mitsuokella multacidus* también produce C18:1 c9, pero no es productora de ácido butírico.

2.3.3 Efecto del consumo de alimentos concentrados y del pH ruminal sobre la digestión del alimento

[Russell y Wilson \(1996\)](#) demostraron que las bacterias celulolíticas no pueden crecer en medios ácidos con celobiosa como nutriente. Estas bacterias son muy sensibles a una reducción del pH, lo que implica que a medida que disminuye el pH en el rumen se provoca un efecto negativo sobre la digestibilidad de la fibra. El pH ruminal es crucial para un funcionamiento normal y estable del rumen, en concreto para la degradación de la fibra, ya que afecta de forma importante a la microbiota ruminal, a su crecimiento y actividad enzimática ([Zebeli y Metzler-Zebeli, 2012](#)).

El pH ruminal afecta tanto a la adherencia de las bacterias a los carbohidratos del alimento como a la hidrólisis enzimática de la celulosa y los polisacáridos estructurales. Con valores de pH superiores a 6 se obtiene una adecuada colonización y adherencia microbianas, y una rápida degradación por enzimas celulolíticas y fibrolíticas. Sin embargo, con valores de pH ruminal entre 5,4 y 6,0 se reducen la adherencia de las bacterias y la actividad enzimática celulolítica. Valores de pH inferiores a 5,2 hacen que las bacterias puedan perder su capacidad de adherencia, se puedan lisar y pueda cesar la hidrólisis de la celulosa y otros carbohidratos estructurales ([Mourino y col., 2001](#)).

El efecto del pH sobre la fermentación microbiana en el rumen depende no solo de la magnitud de la disminución del pH sino, además, del tiempo durante el cual el pH se mantiene por debajo de su nivel óptimo ([de Veth y Kolver, 2001](#); [Cerrato-Sanchez y col., 2007b](#); [Cerrato-Sanchez y col., 2007a](#)). De esta forma, no se observaron cambios apreciables en la fermentación ruminal *in vitro* cuando el pH se mantuvo a 5,6 durante 4 h/d o a 5,1 durante 2 h/d; pero cuando el pH se

mantuvo a 5,1 durante 4 h/d, se observó una inhibición significativa de la fermentación microbiana ([Cerrato-Sanchez y col., 2008](#)).

[Cantalapiedra-Hijar y col. \(2009\)](#) observaron que con dietas ricas en alimentos concentrados la digestibilidad de los nutrientes, con la excepción de la fibra, era mayor que con dietas forrajeras. Sin embargo, el efecto estuvo asociado a los componentes de la ración. La digestibilidad de la proteína, la retención de N, la concentración de amoníaco ruminal y la excreción urinaria de derivados púricos aumentó cuando el alimento concentrado suplementaba dietas compuestas por heno de gramínea, pero no cuando las dietas incluyeron alfalfa. El aumento en la digestibilidad puede deberse a un mayor aporte de hidratos de carbono no estructurales, más digestibles, cuando se reduce la proporción de forraje en la ración, lo que indica que la caída de pH no tiene, inicialmente, efectos adversos sobre los microorganismos responsables de la digestión de dichos carbohidratos. Si la caída de pH ruminal es muy severa, se inhibe la población microbiana y todos los procesos de fermentación, y se reduce la digestión de todos los nutrientes en el rumen.

2.3.4 Efecto del consumo de alimentos concentrados y del pH ruminal sobre la producción de metano

En experimentos *in vitro* se ha visto que la reducción del pH ruminal puede disminuir la producción de metano. Cuando bacterias procedentes de ganado alimentado con mezclas de concentrado y forraje o solo con forraje se incubaron a valores de pH entre 5,7 y 6,5, la tasa de producción de metano disminuyó en ambos casos con la disminución del pH ([Lana y col., 1998](#)). También se ha observado *in vitro* que la inhibición de la metanogénesis debida a la adición de los ácidos grasos C12 y C14 fue más efectiva a un pH entre 5 y 6 que a un pH 7 ([Zhou y col., 2015](#)). [Van Kessel y Russell \(1996\)](#) observaron que la metanogénesis ruminal se inhibía *in vitro* en un medio libre de protozoos cuando el pH descendía hasta 6.

Sin embargo, *in vivo* se ha observado que la producción de CH₄ (g/h) no disminuye cuando el pH declina a niveles inferiores a 5,5 y que la emisión diaria media de CH₄ (g/d) y el pH ruminal se correlacionan solo moderadamente, sugiriendo que además del pH otros factores son determinantes de la menor

producción de metano cuando fermentan raciones ricas en granos, como son el incremento en la formación de propionato o un mayor ritmo de tránsito. Es posible la existencia de mecanismos por los que las arqueas metanogénicas son capaces de sobrevivir a episodios de bajo pH ruminal, tales como cambios en la estructura de las comunidades hacia cepas más tolerantes al bajo pH o la ubicación en microambientes dentro de biopelículas o junto a los protozoos donde las arqueas se protegen del pH ácido ([Hunerberg y col., 2015](#)). En el mismo sentido [Hook y col. \(2011\)](#) no observaron diferencias en la abundancia de microorganismos metanogénicos en el líquido ruminal cuando fermentaba una ración compuesta exclusivamente por heno (pH ruminal entre 6,2 y 6,7) o con una ración compuesta por un 35 % de heno y un 65 % de cereal (pH ruminal entre 5,7 y 6,7). Sin embargo, con la ración más concentrada disminuyó la diversidad de microorganismos metanogénicos y cambió la estructura de esta comunidad bacteriana y aumentó el número de protozoos. Por lo tanto, la disminución del pH ruminal por sí misma no parece efectiva para mitigar las emisiones de CH₄.

In vivo también se ha observado que el incremento en la proporción de concentrado en la dieta disminuye la emisión de metano por unidad de alimento ingerido y por unidad de producto animal si el nivel de producción se mantiene igual o se incrementa. Sin embargo, cabe esperar una respuesta marcada cuando la proporción de concentrado en la dieta es superior a un 35-40 % y es afectada por el nivel de consumo ([Aguerre y col., 2011](#); [Hristov y col., 2013](#)). En experimentos *in vitro* también se ha observado que la dietas con una mayor proporción de concentrado el patrón de fermentación se caracteriza por un menor ratio acetato:propionato, lo que indicaría, previsiblemente, una menor producción de metano ([Russell, 1998](#)). Sin embargo, la relación entre la dieta de los animales donantes de inóculo y el substrato fermentación puede afectar a la relación entre las producciones de acético, propiónico y metano ([Martínez y col., 2010](#)). Finalmente, se ha establecido una buena correlación entre la producción de metano *in vitro* e *in vivo* cuando los resultados se expresan en relación a la materia orgánica fermentada (*in vitro*) y a la materia orgánica potencialmente fermentable (*in vivo*) ([Hatew y col., 2015](#)).

2.4 BIBLIOGRAFÍA

- AbuGhazaleh, A., and Ishlak, A. (2014). Effects of incremental amounts of fish oil on trans fatty acids and Butyrvibrio bacteria in continuous culture fermenters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98, 271-278.
- AbuGhazaleh, A. A. (2008). Effect of fish oil and sunflower oil supplementation on milk conjugated linoleic acid content for grazing dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 141, 220-232.
- AbuGhazaleh, A. A., Felton, D. O., and Ibrahim, S. A. (2007). Milk conjugated linoleic acid response to fish oil and sunflower oil supplementation to dairy cows managed under two feeding systems. *Journal of Dairy Science*, 90, 4763-4769.
- AbuGhazaleh, A. A., Holmes, L. D., Jacobson, B. N., and Kalscheur, K. F. (2006). Short communication: Eicosatrienoic acid and docosatrienoic acid do not promote vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures. *Journal of Dairy Science*, 89, 4336-4339.
- AbuGhazaleh, A. A., and Jenkins, T. C. (2004). Short communication: Docosaehaenoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. *Journal of Dairy Science*, 87, 1047-1050.
- AbuGhazaleh, A. A., Potu, R. B., and Ibrahim, S. (2009). Short communication: The effect of substituting fish oil in dairy cow diets with docosaehaenoic acid-micro algae on milk composition and fatty acids profile. *Journal of Dairy Science*, 92, 6156-6159.
- Adler, S. A., Jensen, S. K., Thuen, E., Gustavsson, A.-M., Harstad, O., and Steinshamn, H. (2013). Effect of silage botanical composition on ruminal biohydrogenation and transfer of fatty acids to milk in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96, 1135-1147.
- Aguerre, M. J., Wattiaux, M. A., Powell, J. M., Broderick, G. A., and Arndt, C. (2011). Effect of forage-to-concentrate ratio in dairy cow diets on emission of methane, carbon dioxide, and ammonia, lactation performance, and manure excretion. *Journal of Dairy Science*, 94, 3081-3093.
- Arefaine, H., and Bertilsson, J. (2017). Effect of feeding high forage diet on cow's milk fatty acids interest of human health. *European Journal of Food Science and Technology*, 5, 29-38.
- Artegoitia, V. M., Foote, A. P., Lewis, R. M., and Freetly, H. C. (2017). Rumen fluid metabolomics analysis associated with feed efficiency on crossbred steers. *Scientific reports*, 7(1), 2864. Retrieve from: <http://digitalcommons.unl.edu/animalscifacpub/974>
- Bauman, D., Barbano, D., Dwyer, D., and Griinari, J. (2000). Technical note: Production of butter with enhanced conjugated linoleic acid for use in biomedical studies with animal models. *Journal of Dairy Science*, 83, 2422-2425.
- Bauman, D. E., and Griinari, J. M. (2001). Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science*, 70, 15-29.
- Baumgard, L. H., Corl, B. A., Dwyer, D. A., Saebo, A., and Bauman, D. E. (2000). Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 278, R179-R184.

- Bayat, A., Ventto, L., Kairenius, P., Stefański, T., Leskinen, H., Tapio, I., Negussie, E., Vilkkii, J., and Shingfield, K. (2017). Dietary forage to concentrate ratio and sunflower oil supplement alter rumen fermentation, ruminal methane emissions, and nutrient utilization in lactating cows. *Translational Animal Science*, 1, 277-286. Retrieve from Doi:10.2527/tas2017.0032
- Beauchemin, K. A., and McGinn, S. M. (2006). Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *Journal of Animal Science*, 84, 1489-1496.
- Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Benchaar, C., and Holtshausen, L. (2009). Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: Effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. *Journal of Dairy Science*, 92, 2118-2127.
- Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., and Petit, H. V. (2007). Methane abatement strategies for cattle: Lipid supplementation of diets. *Canadian Journal of Animal Science*, 87, 431-440.
- Belenguer, A., Toral, P. G., Frutos, P., and Hervás, G. (2010). Changes in the rumen bacterial community in response to sunflower oil and fish oil supplements in the diet of dairy sheep. *Journal of Dairy Science*, 93, 3275-3286.
- Belury, M. A. (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition*, 22, 505-531.
- Bernal-Santos, G., Perfield, J. W., Barbano, D. M., Bauman, D. E., and Overton, T. R. (2003). Production responses of dairy cows to dietary supplementation with conjugated linoleic acid (CLA) during the transition period and early lactation. *Journal of Dairy Science*, 86, 3218-3228.
- Bernard, L., Leroux, C., Rouel, J., Bonnet, M., and Chilliard, Y. (2012). Effect of the level and type of starchy concentrate on tissue lipid metabolism, gene expression and milk fatty acid secretion in Alpine goats receiving a diet rich in sunflower-seed oil. *British Journal of Nutrition*, 107, 1147-1159.
- Bernard, L., Toral, P., Rouel, J., and Chilliard, Y. (2016). Effects of extruded linseed and level and type of starchy concentrate in a diet containing fish oil on dairy goat performance and milk fatty acid composition. *Animal Feed Science and Technology*, 222, 31-42.
- Boadi, D., Benchaar, C., Chiquette, J., and Massé, D. (2004). Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Canadian Journal of Animal Science*, 84, 319-335.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Dijkstra, J., Issa-Zacharia, A., Van Nespen, T., Van Straalen, W., and Fievez, V. (2008a). Effect of dietary starch or micro algae supplementation on rumen fermentation and milk fatty acid composition of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91, 4714-4727.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Fievez, V., Maignien, L., Dijkstra, J., and Boon, N. (2008b). Accumulation of trans C-18:1 fatty acids in the rumen after dietary algal supplementation is associated with changes in the *Butyrivibrio* community. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 6923-6930.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Mestdagh, J., and Fievez, V. (2007). *In vitro* examination of DHA-edible micro algae: 1. Effect on rumen lipolysis and biohydrogenation of linoleic and linolenic acids. *Animal Feed Science and Technology*, 136, 63-79.
- Broucek, J. (2018). Options to methane production abatement in ruminants: A review. *JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences*, 28, 348-364.

- Buccioni, A., Decandia, M., Minieri, S., Molle, G., and Cabiddu, A. (2012). Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Animal Feed Science and Technology*, 174, 1-25.
- Calsamiglia, S., Blanch, M., Ferret, A., and Moya, D. (2012). Is subacute ruminal acidosis a pH related problem? Causes and tools for its control. *Animal Feed Science and Technology*, 172, 42-50.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Yanez-Ruiz, D. R., Martin-Garcia, A. I., and Molina-Alcaide, E. (2009). Effects of forage: concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats. *Journal of Animal Science*, 87, 622-631.
- Castagnino, P. d. S., Messana, J. D., Fiorentini, G., De Jesus, R., San Vito, E., Carvalho, I., and Berchielli, T. (2015). Glycerol combined with oils did not limit biohydrogenation of unsaturated fatty acid but reduced methane production *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 201, 14-24.
- Cerrato-Sanchez, M., Calsamiglia, S., and Ferret, A. (2007a). Effects of patterns of suboptimal pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *Journal of Dairy Science*, 90, 4368-4377.
- Cerrato-Sanchez, M., Calsamiglia, S., and Ferret, A. (2007b). Effects of time at suboptimal pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *Journal of Dairy Science*, 90, 1486-1492.
- Cerrato-Sanchez, M., Calsamiglia, S., and Ferret, A. (2008). Effect of the magnitude of the decrease of rumen pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *Journal of Animal Science*, 86, 378-383.
- Cheeke, P. R. (2000). Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. *Journal of Animal Science*, 77, 1-10.
- Chilliard, Y., and Ferlay, A. (2004). Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Development*, 44, 467-492.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., and Doreau, M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 828-855.
- Choi, N.-J., Imm, J. Y., Oh, S., Kim, B.-C., Hwang, H.-J., and Kim, Y. J. (2005). Effect of pH and oxygen on conjugated linoleic acid (CLA) production by mixed rumen bacteria from cows fed high concentrate and high forage diets. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 643-653.
- Chouinard, P. Y., Corneau, L., Butler, W. R., Chilliard, Y., Drackley, J. K., and Bauman, D. E. (2001). Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *Journal of Dairy Science*, 84, 680-690.
- Chow, T. T., Fievez, V., Moloney, A. P., Raes, K., Demeyer, D., and De Smet, S. (2004). Effect of fish oil on *in vitro* rumen lipolysis, apparent biohydrogenation of linoleic and linolenic acid and accumulation of biohydrogenation intermediates. *Animal Feed Science and Technology*, 117, 1-12.

- Cieślak, A., El-Sherbiny, M., Szczechowiak, D. K., Kowalczyk, D., Pers-Kamczyc, E., Bryszak, M., Szulc, P., Jóźwik, A., and Szumacher-Strabel, M. (2015). Rapeseed and fish oil mixtures supplied at low dose can modulate milk fatty acid composition without affecting rumen fermentation and productive parameters in dairy cows. *Animal Science Papers and Reports*, 33, 357-372.
- Cieslak, A., Szumacher-Strabel, M., Szymankiewicz, E., Piekniowski, M., Oleszak, P., Siwinski, L., and Potkanski, A. (2006). Coconut oil reduces protozoa count and methane release during fermentation in a RUSITEC system. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 15, 19-22.
- Collomb, M., Sieber, R., and Butikofer, U. (2004). CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. *Lipids*, 39, 355-364.
- Colman, E., Fokkink, W. B., Craninx, M., Newbold, J. R., De Baets, B., and Fievez, V. (2010). Effect of induction of subacute ruminal acidosis on milk fat profile and rumen parameters. *Journal of Dairy Science*, 93, 4759-4773.
- Colman, E., Khafipour, E., Vlaeminck, B., De Baets, B., Plaizier, J. C., and Fievez, V. (2013). Grain-based versus alfalfa-based subacute ruminal acidosis induction experiments: Similarities and differences between changes in milk fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 96, 4100-4111.
- Coppock, C. E., and Wilks, D. L. (1991). Supplemental fat in high-energy rations for lactating cows: Effects on intake, digestion, milk yield, and composition. *Journal of Animal Science*, 69, 3826-3837.
- Corl, B., Baumgard, L., Griinari, J. M., Delmonte, P., Morehouse, K., Yurawecz, M., and Bauman, D. (2002). Trans-7,cis-9 CLA is synthesized endogenously by $\Delta 9$ -desaturase in dairy cows. *Lipids*, 37, 681-688.
- Corl, B. A., Baumgard, L. H., Dwyer, D. A., Griinari, J. M., Phillips, B. S., and Bauman, D. E. (2001). The role of $\Delta 9$ -desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12, 622-630.
- Cosgrove, G., Waghorn, G., Anderson, C., Peters, J., Smith, A., Molano, G., and Deighton, M. (2008). The effect of oils fed to sheep on methane production and digestion of ryegrass pasture. *Animal Production Science*, 48, 189-192.
- Dang Van, Q., Focant, M., Mignolet, E., Turu, C., Froidmont, E., and Larondelle, Y. (2011). Influence of the diet structure on ruminal biohydrogenation and milk fatty acid composition of cows fed extruded linseed. *Animal Feed Science and Technology*, 169, 1-10.
- de Veth, M. J., and Kolver, E. S. (2001). Diurnal variation in pH reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 84, 2066-2072.
- Devendra, C., and Lewis, D. (1974). The interaction between dietary lipids and fibre in the sheep 2. Digestibility studies. *Animal Science*, 19, 67-76.
- Dewanckele, L., Vlaeminck, B., Hernandez-Sanabria, E., Ruiz-González, A., Debruyne, S., Jeyanathan, J., and Fievez, V. (2018). Rumen biohydrogenation and microbial community changes upon early life supplementation of 22: 6n-3 enriched microalgae to goats. *Frontiers in Microbiology*, 9, 573. Retrieve from Doi:10.3389/fmicb.2018.00573
- Dhiman, T. R., Satter, L. D., Pariza, M. W., Galli, M. P., Albright, K., and Tolosa, M. X. (2000). Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *Journal of Dairy Science*, 83, 1016-1027.

- Edwards, H. D., Anderson, R. C., Taylor, T. M., Miller, R. K., Hardin, M. D., Nisbet, D. J., Krueger, N. A., and Smith, S. B. (2013). Interactions between oil substrates and glucose on pure cultures of ruminal lipase-producing bacteria. *Lipids*, 48, 749-755.
- El-Sherbiny, M., Cieślak, A., Szczechowiak, J., Kołodziejski, P., Szulc, P., and Szumacher-Strabel, M. (2016). Effect of nanoemulsified oils addition on rumen fermentation and fatty acid proportion in a rumen simulation technique. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 25, 116-124.
- Elgersma, A. (2015). Grazing increases the unsaturated fatty acid concentration of milk from grass-fed cows: A review of the contributing factors, challenges and future perspectives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117, 1345-1369.
- Enjalbert, F., Combes, S., Zened, A., and Meynadier, A. (2017). Rumen microbiota and dietary fat: A mutual shaping. *Journal of Applied Microbiology*, 123, 782-797.
- Fellner, V., Sauer, F. D., and Kramer, J. K. G. (1995). Steady-state rates of linoleic acid biohydrogenation by ruminal bacteria in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 78, 1815-1823.
- Ferlay, A., Bernard, L., Meynadier, A., and Malpuech-Brugère, C. (2017). Production of trans and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. *Biochimie*, 141, 107-120.
- Ferlay, A., Capitan, P., Ollier, A., and Chilliard, Y. (2003). *Interactions between nature of forage and oil supplementation on cow milk composition. 3. Effects on kinetics of percentages of milk CLA and trans fatty acids*. Paper presented at the Abstracts of the 54th Annual Meeting of European Association for Animal Production, Rome.
- Fievez, V., Dohme, F., Danneels, M., Raes, K., and Demeyer, D. (2003). Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. *Animal Feed Science and Technology*, 104, 41-58.
- Fuentes, M., Calsamiglia, S., Fievez, V., Blanch, M., and Mercadal, D. (2011). Effect of pH on ruminal fermentation and biohydrogenation of diets rich in omega-3 or omega-6 fatty acids in continuous culture of ruminal fluid. *Animal Feed Science and Technology*, 169, 35-45.
- Fuentes, M. C., Calsamiglia, S., Cardozo, P. W., and Vlaeminck, B. (2009). Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 92, 4456-4466.
- Fukuda, S., Suzuki, Y., Murai, M., Asanuma, N., and Hino, T. (2006). Augmentation of vaccenate production and suppression of vaccenate biohydrogenation in cultures of mixed ruminal microbes. *Journal of Dairy Science*, 89, 1043-1051.
- Fuquay, J. W., Fox, P. F., and McSweeney, P. L. H. (2011). *Encyclopedia of dairy sciences*. Amsterdam: Elsevier.
- Gama, M. A. S., Garnsworthy, P. C., Griinari, J. M., Leme, P. R., Rodrigues, P. H. M., Souza, L. W. O., and Lanna, D. P. D. (2008). Diet-induced milk fat depression: Association with changes in milk fatty acid composition and fluidity of milk fat. *Livestock Science*, 115, 319-331.

- Gerson, T., John, A., and King, A. S. D. (1985). The effects of dietary starch and fibre on the *in vitro* rates of lipolysis and hydrogenation by sheep rumen digesta. *The Journal of Agricultural Science*, 105, 27-30.
- Gerson, T., John, A., and Sinclair, B. (1983). The effect of dietary N on *in vitro* lipolysis and fatty acid hydrogenation in rumen digesta from sheep fed diets high in starch. *The Journal of Agricultural Science*, 101, 97-101.
- Gerson, T., King, A., Kelly, K. E., and Kelly, W. (1988). Influence of particle size and surface area on *in vitro* rates of gas production, lipolysis of triacylglycerol and hydrogenation of linoleic acid by sheep rumen digesta or *Ruminococcus flavefaciens*. *The Journal of Agricultural Science*, 110, 31-37.
- Giesy, J. G., McGuire, M. A., Shafii, B., and Hanson, T. W. (2002). Effect of dose of calcium salts of conjugated linoleic acid (CLA) on percentage and fatty acid content of milk fat in midlactation Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 85, 2023-2029.
- Giger-Reverdin, S., Morand-Fehr, P., and Tran, G. (2003). Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle. *Livestock Production Science*, 82, 73-79.
- Gómez-Cortés, P., Cívico, A., de la Fuente, M., Juárez, M., Sánchez, N. N., Blanco, F. P., and Marín, A. M. (2017). Dietary linseed oil increases trans-10, cis-15 18: 2 in caprine milk fat. *Journal of Dairy Science*, 100, 4235-4240.
- González, L., Manteca, X., Calsamiglia, S., Schwartzkopf-Genswein, K., and Ferret, A. (2012). Ruminant acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). *Animal Feed Science and Technology*, 172, 66-79.
- Gorissen, L., Leroy, F., De Vuyst, L., De Smet, S., and Raes, K. (2015). Bacterial production of conjugated linoleic and linolenic acid in foods: A technological challenge. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 1561-1574.
- Griinari, J. M., Corl, B. A., Lacy, S. H., Chouinard, P. Y., Nurmela, K. V. V., and Bauman, D. E. (2000). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *Journal of Nutrition*, 130, 2285-2291.
- Griinari, M. K., and Bauman, D. E. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, y G. J. Nelson (Eds.), *Advances in conjugated linoleic acid research* (Vol. 1, pp. 180-200). Champaign, Ill. USA: AOCS Press.
- Gudla, P., AbuGhazaleh, A., Ishlak, A., and Jones, K. (2012a). The effect of level of forage and oil supplement on biohydrogenation intermediates and bacteria in continuous cultures. *Animal Feed Science and Technology*, 171, 108-116.
- Gudla, P., Ishlak, A., and AbuGhazaleh, A. (2012b). The effect of forage level and oil supplement on *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Anaerovibrio lipolytica* in continuous culture fermenters. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25, 234-239.
- Harfoot, C. G., Crouchman, M. L., Noble, R. C., and Moore, J. H. (1974). Competition between food particles and rumen bacteria in the uptake of long-chain fatty acids and triglycerides. *Journal of Applied Microbiology*, 37, 633-641.

- Harfoot, C. G., and Hazlewood, G. P. (1997). Lipid metabolism in the rumen. In P. N. Hobson y C. S. Stewart (Eds.), *The rumen microbial ecosystem*. London; New York: Blackie Academic & Professional.
- Harvatine, K. J., and Allen, M. S. (2006). Fat supplements affect fractional rates of ruminal fatty acid biohydrogenation and passage in dairy cows. *Journal of Nutrition*, 136, 677-685.
- Hatew, B., Cone, J., Pellikaan, W., Podesta, S., Bannink, A., Hendriks, W., and Dijkstra, J. (2015). Relationship between *in vitro* and *in vivo* methane production measured simultaneously with different dietary starch sources and starch levels in dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 202, 20-31.
- Hervás, G., Luna, P., Mantecon, A. R., Castañares, N., Frutos, P., de la Fuente, M. A., and Juárez, M. (2006, 1 - 4 October). *Effect of sunflower oil on sheep milk production and composition, and in vitro rumen fermentation*. Paper presented at the 4th Euro Fed Lipid Congress; Fats, Oils and Lipids for a Healthier Future - Workshop on "Biohydrogenation", University of Madrid (UCM), Spain.
- Hess, B. W., Moss, G. E., and Rule, D. C. (2008). A decade of developments in the area of fat supplementation research with beef cattle and sheep. *Journal of Animal Science*, 86, E188-204.
- Hess, H. D., Kreuzer, M., Díaz, T. E., Lascano, C. E., Carulla, J. E., Soliva, C. R., and Machmüller, A. (2003). Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology*, 109, 79-94.
- Hobson, P. N., and Stewart, C. S. (1997). *The rumen microbial ecosystem*. London: Springer Science & Business Media.
- Holtshausen, L., Chaves, A. V., Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., McAllister, T. A., Odongo, N. E., Cheeke, P. R., and Benchaar, C. (2009). Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92, 2809-2821.
- Hook, S. E., Steele, M. A., Northwood, K. S., Wright, A.-D. G., and McBride, B. W. (2011). Impact of high-concentrate feeding and low ruminal pH on methanogens and protozoa in the rumen of dairy cows. *Microbial Ecology*, 62, 94-105.
- Horcada, A., Ripoll, G., Alcalde, M. J., Sanudo, C., Teixeira, A., and Panea, B. (2012). Fatty acid profile of three adipose depots in seven Spanish breeds of suckling kids. *Meat Science*, 92, 89-96.
- Hristov, A., Oh, J., Firkins, J., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H., Adesogan, A., Yang, W., and Lee, C. (2013). Special topics—mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science*, 91, 5045-5069.
- Huffman, C. F. (1961). High-level grain feeding for dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 44, 2113-2122.
- Hunerberg, M., McGinn, S. M., Beauchemin, K. A., Entz, T., Okine, E. K., Harstad, O. M., and McAllister, T. A. (2015). Impact of ruminal pH on enteric methane emissions. *Journal of Animal Science*, 93, 1760-1766.

- Hur, S. J., Kim, H. S., Bahk, Y. Y., and Park, Y. (2017). Overview of conjugated linoleic acid formation and accumulation in animal products. *Livestock Science*, 195, 105-111.
- Huws, S. A., Lee, M. R. F., Muetzel, S. M., Scott, M. B., Wallace, R. J., and Scollan, N. D. (2010). Forage type and fish oil cause shifts in rumen bacterial diversity. *FEMS Microbiology Ecology*, 73, 396-407.
- Ishler, V. A., Heinrichs, A. J., and Varga, G. B. (1996). *From feed to milk: Understanding rumen function* (Vol. 422). University Park, PA: Pennsylvania State University.
- Jacob, A. B., Balakrishnan, V., and Kathirvelan, C. (2012). Effect of amount and source of vegetable oils in a high fibrous cattle diet on *in vitro* rumen fermentation, nutrient degradability and rumen cis-9, trans-11 CLA concentration. *Journal of Applied Animal Research*, 40, 148-153.
- Jahreis, G., Fritsche, J., and Kraft, J. (1999). Species dependent, seasonal, and dietary variation of conjugated linoleic acid in milk. . In M. P. Yurawecz, M.M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, y G. J. Nelson (Eds.), *Advances in conjugated linoleic acid research* (Vol. 1, pp. 215-225). Champaign, Ill.: AOCS Press.
- Jalc, D., Certik, M., Kundrikova, K., and Namestkova, P. (2007). Effect of unsaturated C-18 fatty acids (oleic, linoleic and alpha-linolenic acid) on ruminal fermentation and production of fatty acid isomers in an artificial rumen. *Veterinarni Medicina*, 52, 87-94.
- Jalc, D., Varadyova, Z., and Laukova, A. (2010). Effect of inoculated corn silage enriched with sunflower oil on rumen fermentation and lipid metabolism in an artificial rumen (RUSITEC). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 78-84.
- Jenkins, T. C. (1993). Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 76, 3851-3863.
- Jenkins, T. C. (1994). Regulation of lipid metabolism in the rumen. *The Journal of Nutrition*, 124, 1372S-1376G.
- Jenkins, T. C., Wallace, R. J., Moate, P. J., and Mosley, E. E. (2008). Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science*, 86, 397-412.
- Johnson, K. A., and Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73, 2483-2492.
- Kairenius, P., Leskinen, H., Toivonen, V., Muetzel, S., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Wallace, R., and Shingfield, K. (2018). Effect of dietary fish oil supplements alone or in combination with sunflower and linseed oil on ruminal lipid metabolism and bacterial populations in lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 101, 3021-3035.
- Kargar, S., Khorvash, M., Ghorbani, G. R., Alikhani, M., and Yang, W. Z. (2010). Short communication: Effects of dietary fat supplements and forage:concentrate ratio on feed intake, feeding, and chewing behavior of Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93, 4297-4301.
- Karlsson, L., Hetta, M., Uden, R., and Martinsson, K. (2009). New methodology for estimating rumen protein degradation using the *in vitro* gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, 153, 193-202.

- Kelly, M. L., Berry, J. R., Dwyer, D. A., Griinari, J. M., Chouinard, P. Y., Van Amburgh, M. E., and Bauman, D. E. (1998). Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *Journal of Nutrition*, 128, 881-885.
- Kepler, C. R., Hiron, K. P., McNeill, J. J., and Tove, S. B. (1966). Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry*, 241, 1350-1354.
- Kepler, C. R., and Tove, S. B. (1967). Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Iii. Purification and properties of a linoleate δ^{12} -cis, δ^{11} -trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 5686-5692.
- Kesler, E., and Spahr, S. (1964). Physiological effects of high level concentrate feeding. *Journal of Dairy Science*, 47, 1122-1128.
- Khanal, R. C. (2004). Potential health benefits of conjugated linoleic acid (CLA): A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 17, 1315-1328.
- Khanal, R. C., and Dhiman, T. R. (2004). Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): A review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3, 72-81.
- Khanal, R. C., and Dhiman, T. R. (2007). Status of milk fat conjugated linoleic acid (CLA) in selected commercial dairies. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 20, 1525-1538.
- Khiaosa-Ard, R., Bryner, S. F., Scheeder, M. R. L., Wettstein, H. R., Leiber, F., Kreuzer, M., and Soliva, C. R. (2009). Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal alpha-linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. *Journal of Dairy Science*, 92, 177-188.
- Khiaosa-ard, R., Klevenhusen, F., Soliva, C. R., Kreuzer, M., and Leiber, F. (2010). Transfer of linoleic and linolenic acid from feed to milk in cows fed isoenergetic diets differing in proportion and origin of concentrates and roughages. *Journal of Dairy Research*, 77, 331-336.
- Kleen, J., Hooijer, G., Rehage, J., and Noordhuizen, J. (2003). Subacute ruminal acidosis (SARA): A review. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 50, 406-414.
- Krause, K. M., and Oetzel, G. R. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 126, 215-236.
- Lana, R. P., Russell, J. B., and Van Amburgh, M. E. (1998). The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *Journal of Animal Science*, 76, 2190-2196.
- Lascano, G. J., Alende, M., Koch, L. E., and Jenkins, T. C. (2016). Changes in fermentation and biohydrogenation intermediates in continuous cultures fed low and high levels of fat with increasing rates of starch degradability. *Journal of Dairy Science*, 99, 6334-6341.
- Lassey, K. R., Ulyatt, M. J., Martin, R. J., Walker, C. F., and David Shelton, I. (1997). Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. *Atmospheric Environment*, 31, 2905-2914.
- Latham, M. J., Serry, J. E., and Sharpe, M. E. (1972). Effect of low-roughage diets on the microflora and lipid metabolism in the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 24, 871-877.

- Leahy, S. C., Kelly, W. J., Altermann, E., Ronimus, R. S., Yeoman, C. J., Pacheco, D. M., Li, D., Kong, Z., McTavish, S., Sang, C., Lambie, S. C., Janssen, P. H., Dey, D., and Attwood, G. T. (2010). The genome sequence of the rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. *PLoS ONE*, 5(1), e8926. Retrieve from Doi:10.1371/journal.pone.0008926
- Leduc, M., Gervais, R., Tremblay, G., Chiquette, J., and Chouinard, P. (2017). Milk fatty acid profile in cows fed red clover-or alfalfa-silage based diets differing in rumen-degradable protein supply. *Animal Feed Science and Technology*, 223, 59-72.
- Lee, M., Cabiddu, A., Niderkorn, V., Hou, F., Kim, E., and Scollan, N. (2010). *In vitro* rumen simulated metabolism (RUSITEC) of freshly cut or wilted grasses with contrasting polyphenol oxidase activities: The effect on rumen parameters, lipolysis and biohydrogenation. *Advances in Animal Biosciences*, 1, 205-205.
- Lee, Y.-J., and Jenkins, T. C. (2011). Biohydrogenation of linolenic acid to stearic acid by the rumen microbial population yields multiple intermediate conjugated diene isomers. *The Journal of Nutrition*, 141, 1445-1450.
- Leng, R., and Nolan, J. (1984). Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 67, 1072-1089.
- Li, X. Z., Gao, Q. S., Yan, C. G., Choi, S. H., Shin, J. S., and Song, M. K. (2015). Conjugated fatty acids and methane production by rumen microbes when incubated with linseed oil alone or mixed with fish oil and/or malate. *Animal Science Journal*, 86, 755-764.
- Lock, A. L., and Garnsworthy, P. C. (2002). Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. *Animal Science*, 74, 163-176.
- Loor, J. J., Bandara, A. B. P. A., and Herbein, J. H. (2002). Characterization of 18:1 and 18:2 isomers produced during microbial biohydrogenation of unsaturated fatty acids from canola and soya bean oil in the rumen of lactating cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 86, 422-432.
- Loor, J. J., Ueda, K., Ferlay, A., Chilliard, Y., and Doreau, M. (2004). Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87, 2472-2485.
- Lourenco, M., Ramos-Morales, E., and Wallace, R. J. (2010). The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal*, 4, 1008-1023.
- Luna, P., Fontecha, J., Juárez, M., and De la Fuente, M. A. (2004, Octubre). *Effects of a diet supplemented with linseed on the polyunsaturated fatty acid content in ewes' milk*. Paper presented at the Simposium Internacional: Future of the sheep and goats dairy sector, Zaragoza, Spain.
- Lv, X., Mao, S., and Zhu, W. (2016). Impairment of rumen biohydrogenation and bacteria of the Butyrivibrio group in the rumen of goats through a 20: 5 n-3 (EPA) rich supplement. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 474-483.

- Machmüller, A. (2006). Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 112, 107-114.
- Machmüller, A., Ossowski, D. A., Wanner, M., and Kreuzer, M. (1998). Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation *in vitro* (RUSITEC). *Animal Feed Science and Technology*, 71, 117-130.
- Mackie, R., McSweeney, C., and Klieve, A. (2002). Microbial ecology of the ovine rumen. *Sheep Nutrition*, 71-94.
- Maia, M. R., Chaudhary, L. C., Bestwick, C. S., Richardson, A. J., McKain, N., Larson, T. R., Graham, I. A., and Wallace, R. J. (2010). Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiology*, 10(1), 52. Retrieve from Doi:10.1186/1471-2180-10-52
- Maia, M. R. G., Chaudhary, L. C., Figueres, L., and Wallace, R. J. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91, 303-314.
- Martin, C., Brossard, L., and Doreau, M. (2006a). Mechanisms of appearance of ruminal acidosis and consequences on physiopathology and performances. *Productions Animales*, 19, 93-107.
- Martin, C., Ferlay, A., Chilliard, Y., and Doreau, M. (2007). Rumen methanogenesis of dairy cows in response to increasing levels of dietary extruded linseeds. *Energy and Protein Metabolism and Nutrition*, 609-610.
- Martin, C., Morgavi, D. P., Doreau, M., and Jouany, J. P. (2006b). Comment réduire la production de méthane chez les ruminants? *Fourrages*, 187, 283-300.
- Martin, C., Rouel, J., Jouany, J. P., Doreau, M., and Chilliard, Y. (2008). Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *Journal of Animal Science*, 86, 2642-2650.
- Martínez, M., Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Saro, C., and Carro, M. (2010). The effect of the diet fed to donor sheep on *in vitro* methane production and ruminal fermentation of diets of variable composition. *Animal Feed Science and Technology*, 158, 126-135.
- Martinez Marin, A. L., Gomez-Cortes, P., Gomez Castro, G., Juarez, M., Perez Alba, L., Perez Hernandez, M., and de la Fuente, M. A. (2012). Effects of feeding increasing dietary levels of high oleic or regular sunflower or linseed oil on fatty acid profile of goat milk. *Journal of Dairy Science*, 95, 1942-1955.
- McAllister, T. A., and Newbold, C. J. (2008). Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48, 7-13.
- McGinn, S. M., Beauchemin, K. A., Coates, T., and Colombatto, D. (2004). Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *Journal of Animal Science*, 82, 3346-3356.
- McKain, N., Shingfield, K. J., and Wallace, R. J. (2010). Metabolism of conjugated linoleic acids and 18:1 fatty acids by ruminal bacteria: Products and mechanisms. *Microbiology*, 156, 579-588.

- Meale, S., Chaves, A., He, M., and McAllister, T. (2014). Dose–response of supplementing marine algae (*Schizochytrium spp.*) on production performance, fatty acid profiles, and wool parameters of growing lambs. *Journal of Animal Science*, 92, 2202-2213.
- Messana, J., Carvalho, A., Ribeiro, A., Fiorentini, G., Castagnino, P., Granja-Salcedo, Y., Pires, A., and Berchielli, T. (2016). Effects of different sources of forage in high-concentrate diets on fermentation parameters, ruminal biohydrogenation and microbiota in Nellore feedlot steers. *The Journal of Agricultural Science*, 154, 928-941.
- Millen, D. D., Arrigoni, M. D. B., and Pacheco, R. D. L. (2016). *Rumenology*. Basel, Switzerland: Springer.
- Miller, W. J., and O'Dell, G. D. (1969). Nutritional problems of using maximum forage or maximum concentrates in dairy rations. *Journal of Dairy Science*, 52, 1144-1154.
- Mohammed, R., Stanton, C., Kennelly, J., Kramer, J., Mee, J., Glimm, D., O'Donovan, M., and Murphy, J. (2009). Grazing cows are more efficient than zero-grazed and grass silage-fed cows in milk rumenic acid production. *Journal of Dairy Science*, 92, 3874-3893.
- Morvay, Y., Bannink, A., France, J., Kebreab, E., and Dijkstra, J. (2011). Evaluation of models to predict the stoichiometry of volatile fatty acid profiles in rumen fluid of lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 94, 3063-3080.
- Mosley, E. E., Powell, G. L., Riley, M. B., and Jenkins, T. C. (2002). Microbial biohydrogenation of oleic acid to trans isomers *in vitro*. *Journal of Lipid Research*, 43, 290-296.
- Moss, A. R., Jouany, J.-P., and Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*, 49, 231-253.
- Mourino, F., Akkarawongsa, R., and Weimer, P. J. (2001). Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 84, 848-859.
- Nagaraja, T. (2016). Microbiology of the rumen. In D. Millen, M. De Beni Arrigoni, y R. D. Lauritano Pacheco (Eds.), *Rumenology* (pp. 39-61). Basel, Switzerland: Springer.
- Nagaraja, T., and Titgemeyer, E. (2007). Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. *Journal of Dairy Science*, 90, E17-E38.
- Newbold, C. J., ElHassan, S. M., Wang, J., Ortega, M. E., and Wallace, R. J. (1997). Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *British Journal of Nutrition*, 78, 237-249.
- Orskov, E. R. (1982). *Protein nutrition in ruminants*. London: Academic Press.
- Orskov, E. R. (2012). *Energy nutrition in ruminants*. Barking, Essex: Elsevier Science Ltd.
- Palmquist, D., and Jenkins, T. (2017). A 100-Year Review: Fat feeding of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100, 10061-10077.
- Palmquist, D. L. (2007). Biohydrogenation then and now. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 737-739.
- Palmquist, D. L., and Jenkins, T. C. (1980). Fat in lactation rations: Review. *Journal of Dairy Science*, 63, 1-14.

- Palmquist, D. L., Lock, A. L., Shingfield, K. J., and Bauman, D. E. (2005). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. In L. T. Steve (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. Volume 50, pp. 179-217). London: Academic Press.
- Palmquist, D. L., and Schanbacher, F. L. (1991). Dietary fat composition influences fatty acid composition of milk fat globule membrane in lactating cows. *Lipids*, 26, 718-722.
- Pariza, M. W. (2004). Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 1132S-1136S.
- Patra, A. K., and Yu, Z. (2013). Effects of coconut and fish oils on ruminal methanogenesis, fermentation, and abundance and diversity of microbial populations *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 96, 1782-1792.
- Perfield, J. W., Bernal-Santos, G., Overton, T. R., and Bauman, D. E. (2002). Effects of dietary supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid in dairy cows during established lactation. *Journal of Dairy Science*, 85, 2609-2617.
- Piantoni, P., Lock, A. L., and Allen, M. S. (2013). Palmitic acid increased yields of milk and milk fat and nutrient digestibility across production level of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 96, 7143-7154.
- Piperova, L. S., Sampugna, J., Teter, B. B., Kalscheur, K. F., Yurawecz, M. P., Ku, Y., Morehouse, K. M., and Erdman, R. A. (2002). Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. *The Journal of Nutrition*, 132, 1235-1241.
- Potu, R. B., AbuGhazaleh, A. A., Hastings, D., Jones, K., and Ibrahim, S. A. (2011). The effect of lipid supplements on ruminal bacteria in continuous culture fermenters varies with the fatty acid composition. *The Journal of Microbiology*, 49, 216-223.
- Qiu, X., Eastridge, M. L., Griswold, K. E., and Firkins, J. L. (2004). Effects of substrate, passage rate, and pH in continuous culture on flows of conjugated linoleic acid and trans C-18:1. *Journal of Dairy Science*, 87, 3473-3479.
- Raposo, F., Borja, R., Rincon, B., and Jimenez, A. M. (2008). Assessment of process control parameters in the biochemical methane potential of sunflower oil cake. *Biomass and Bioenergy*, 32, 1235-1244.
- Russell, J. B. (1998). The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 81, 3222-3230.
- Russell, J. B. (2002). *Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition*. Ithaca, N.Y: Cornell University.
- Russell, J. B., and Wilson, D. B. (1996). Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *Journal of Dairy Science*, 79, 1503-1509.
- Saliba, L., Gervais, R., Lebeuf, Y., and Chouinard, P. Y. (2014). Effect of feeding linseed oil in diets differing in forage to concentrate ratio: 1. Production performance and milk fat content of biohydrogenation intermediates of α -linolenic acid. *Journal of Dairy Research*, 81, 82-90.
- Scheehle, E., A, and Kruger, D. (2006). Global anthropogenic methane and nitrous oxide emissions. *The Energy Journal*, 3, 33-44.

- Secchiari, P., Antongiovanni, M., Mele, M., Serra, A., Buccioni, A., Ferruzzi, G., Paoletti, F., and Petacchi, F. (2003). Effect of kind of dietary fat on the quality of milk fat from Italian Friesian cows. *Livestock Production Science*, 83, 43-52.
- Serafeimidou, A., Zlatanov, S., Kritikos, G., and Tourianis, A. (2013). Change of fatty acid profile, including conjugated linoleic acid (CLA) content, during refrigerated storage of yogurt made of cow and sheep milk. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, 24-30.
- Shingfield, K. J., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., Huhtanen, P., and Griinari, M. J. (2004). Synthesis of trans fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid in the rumen of cows fed grass silage based diets supplemented with incremental levels of sunflower oil. *Journal of Dairy Science*, 87, 335-336.
- Shingfield, K. J., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., and Griinari, J. M. (2008). Effect of incremental levels of sunflower-seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows. *British Journal of Nutrition*, 99, 971-983.
- Shingfield, K. J., Bernard, L., Leroux, C., and Chilliard, Y. (2010). Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal*, 4, 1140-1166.
- Shingfield, K. J., and Griinari, J. M. (2007). Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 799-816.
- Shingfield, K. J., Kairenius, P., Ärölä, A., Paillard, D., Muetzel, S., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Toivonen, V., and Griinari, J. M. (2012). Dietary fish oil supplements modify ruminal biohydrogenation, alter the flow of fatty acids at the omasum, and induce changes in the ruminal *Butyrivibrio* population in lactating cows. *The Journal of Nutrition*, 142, 1437-1448.
- Shingfield, K. J., Reynolds, C. K., Hervás, G., Griinari, J. M., Grandison, A. S., and Beever, D. E. (2006). Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89, 714-732.
- Shingfield, K. J., Reynolds, C. K., Lupoli, B., Toivonen, V., Yurawecz, M., Delmonte, P., Griinari, J. M., Grandison, A. S., and Beever, D. E. (2005). Effect of forage type and proportion of concentrate in the diet on milk fatty acid composition in cows given sunflower oil and fish oil. *Animal Science*, 80, 225-238.
- Sinanoglou, V. J., Koutsouli, P., Fotakis, C., Sotiropoulou, G., Cavouras, D., and Bizelis, I. (2015). Assessment of lactation stage and breed effect on sheep milk fatty acid profile and lipid quality indices. *Dairy Science & Technology*, 95, 509-531.
- Siurana, A., Ferret, A., Rodriguez, M., Vlaeminck, B., Fievez, V., and Calsamiglia, S. (2018). Strategies to modify the ruminal biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids and the production of trans-10, cis-12 C18:2 *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 235, 158-165.
- Solomon, S. (2007). *Climate change 2007-the physical science basis: Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC* (Vol. 4). Cambridge, UK: Cambridge University Press.

- Stanton, C., Murphy, J., McGrath, E., and Devery, R. (2003). Animal feeding strategies for conjugated linoleic acid enrichment of milk. In J. L. Sébédio, W. W. Christie, y R. Adlof (Eds.), *Advances in conjugated linoleic acid research* (Vol. 2, pp. 123-143). Champaign, USA: AOCS Press.
- Szczechowiak, J., Szumacher-Strabel, M., El-Sherbiny, M., Pers-Kamczyc, E., Pawlak, P., and Cieslak, A. (2016). Rumen fermentation, methane concentration and fatty acid proportion in the rumen and milk of dairy cows fed condensed tannin and/or fish-soybean oils blend. *Animal Feed Science and Technology*, 216, 93-107.
- Tessmann, N. J., Radloff, H. D., Kleinmans, J., Dhiman, T. R., and Satter, L. D. (1991). Milk production response to dietary forage:grain ratio. *Journal of Dairy Science*, 74, 2696-2707.
- Toral, P., Belenguer, A., Shingfield, K., Hervás, G., Toivonen, V., and Frutos, P. (2012). Fatty acid composition and bacterial community changes in the rumen fluid of lactating sheep fed sunflower oil plus incremental levels of marine algae. *Journal of Dairy Science*, 95, 794-806.
- Toral, P. G., Bernard, L., Belenguer, A., Rouel, J., Hervás, G., Chilliard, Y., and Frutos, P. (2016). Comparison of ruminal lipid metabolism in dairy cows and goats fed diets supplemented with starch, plant oil, or fish oil. *Journal of Dairy Science*, 99, 301-316.
- Toral, P. G., Hervás, G., Carreño, D., Leskinen, H., Belenguer, A., Shingfield, K. J., and Frutos, P. (2017). *In vitro* response to EPA, DPA, and DHA: Comparison of effects on ruminal fermentation and biohydrogenation of 18-carbon fatty acids in cows and ewes. *Journal of Dairy Science*, 100, 6187-6198.
- Toral, P. G., Hervás, G., Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Juárez, M., and de la Fuente, M. A. (2010). Milk fatty acid profile and dairy sheep performance in response to diet supplementation with sunflower oil plus incremental levels of marine algae. *Journal of Dairy Science*, 93, 1655-1667.
- Toral, P. G., Rouel, J., Bernard, L., and Chilliard, Y. (2014). Interaction between fish oil and plant oils or starchy concentrates in the diet: Effects on dairy performance and milk fatty acid composition in goats. *Animal Feed Science and Technology*, 198, 67-82.
- Tremere, A. W., Merrill, W., and Loosli, J. (1968). Adaptation to high concentrate feeding as related to acidosis and digestive disturbances in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 51, 1065-1072.
- Troegeler-Meynadier, A., Bret-Bennis, L., and Enjalbert, F. (2006). Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. *Reproduction Nutrition Development*, 46, 713-724.
- Troegeler-Meynadier, A., Palagiano, C., and Enjalbert, F. (2014). Effects of pH and fermentative substrate on ruminal metabolism of fatty acids during short-term *in vitro* incubation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98, 704-713.
- Tsiplakou, E., Flemetakis, E., Kalloniati, C., Papadomichelakis, G., Katinakis, P., and Zervas, G. (2009). Sheep and goats differences in CLA and fatty acids milk fat content in relation with mRNA stearoyl-CoA desaturase and lipogenic genes expression in their mammary gland. *Journal of Dairy Research*, 76, 392-401.

- Tsiplakou, E., Kominakis, A., and Zervas, G. (2008). The interaction between breed and diet on CLA and fatty acids content of milk fat of four sheep breeds kept indoors or at grass. *Small Ruminant Research*, 74, 179-187.
- Tsiplakou, E., Mountzouris, K. C., and Zervas, G. (2006). The effect of breed, stage of lactation and parity on sheep milk fat CLA content under the same feeding practices. *Livestock Science*, 105, 162-167.
- Uden, P. (2006). *In vitro* studies on microbial efficiency from two cuts of ryegrass (*Lolium perenne*, cv. Aberdart) with different proportions of sugars and protein. *Animal Feed Science and Technology*, 126, 145-156.
- Ungerfeld, E. M., Rust, S. R., Burnett, R. J., Yokoyama, M. T., and Wang, J. K. (2005). Effects of two lipids on *in vitro* ruminal methane production. *Animal Feed Science and Technology*, 119, 179-185.
- Vahmani, P., Fredeen, A. H., and Glover, K. E. (2013). Effect of supplementation with fish oil or microalgae on fatty acid composition of milk from cows managed in confinement or pasture systems. *Journal of Dairy Science*, 96, 6660-6670.
- Vahmani, P., Mapiye, C., Prieto, N., Rolland, D. C., McAllister, T. A., Aalhus, J. L., and Dugan, M. E. R. (2015). The scope for manipulating the polyunsaturated fatty acid content of beef: A review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(1), 29. Retrieve from Doi:10.1186/s40104-015-0026-z
- van Houtert, M. F. J. (1993). The production and metabolism of volatile fatty acids by ruminants fed roughages: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 43, 189-225.
- Van Kessel, J. A. S., and Russell, J. B. (1996). The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiology Ecology*, 20, 205-210.
- Van Nevel, C. J., and Demeyer, D. I. (1996). Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents *in vitro*. *Reproduction Nutrition Development*, 36, 53-63.
- Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. Ithaca and London: Cornell University Press.
- Ventto, L., Leskinen, H., Kairenius, P., Stefański, T., Bayat, A. R., Vilkki, J., and Shingfield, K. J. (2017). Diet-induced milk fat depression is associated with alterations in ruminal biohydrogenation pathways and formation of novel fatty acid intermediates in lactating cows. *British Journal of Nutrition*, 117, 364-376.
- Vlaeminck, B., Fievez, V., Cabrita, A. R. J., Fonseca, A. J. M., and Dewhurst, R. J. (2006). Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 389-417.
- Wallace, R., Devillard, E., and Muetzel, S. (2006). *Recent developments in identification of microbes involved in rumen biohydrogenation*. Paper presented at the Proceedings of the 4th Euro Fed Lipid Congress – Fats, Oils and Lipids for a Healthier Future- Workshop on “Biohydrogenation”, Madrid.
- Wang, J. H., Choi, S. H., and Song, M. K. (2003). Effects of concentrate to roughage ratio on the formation of cis-9, trans-11 CLA and trans-11-octadecenoic acid in rumen fluid and plasma of sheep when fed high oleic or high linoleic acid oils. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16, 1604-1609.

- Wangsness, P. J., and Muller, L. D. (1981). Maximum forage for dairy cows: Review. *Journal of Dairy Science*, 64, 1-13.
- Weimer, P. J., Stevenson, D. M., and Mertens, D. R. (2010). Shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat-depressing conditions. *Journal of Dairy Science*, 93, 265-278.
- Weiss, M. F., Martz, F. A., and Lorenzen, C. L. (2004a). Review: Conjugated linoleic acid: Historical context and implications. *The Professional Animal Scientist*, 20, 118-126.
- Weiss, M. F., Martz, F. A., and Lorenzen, C. L. (2004b). Review: Conjugated linoleic acid: Implicated mechanisms related to cancer, atherosclerosis and obesity. *The Professional Animal Scientist*, 20, 127-135.
- Wencelová, M., Váradyová, Z., Mihaliková, K., Čobanová, K., Plachá, I., Pristaš, P., Jalč, D., and Kišidayová, S. (2015). Rumen fermentation pattern, lipid metabolism and the microbial community of sheep fed a high-concentrate diet supplemented with a mix of medicinal plants. *Small Ruminant Research*, 125, 64-72.
- Whitlock, L., Schingoethe, D., Hippen, A., Kalscheur, K., Baer, R., Ramaswamy, N., and Kasperson, K. (2002). Fish oil and extruded soybeans fed in combination increase conjugated linoleic acids in milk of dairy cows more than when fed separately. *Journal of Dairy Science*, 85, 234-243.
- Yang, S. L., Bu, D. P., Wang, J. Q., Hu, Z. Y., Li, D., Wei, H. Y., Zhou, L. Y., and Loo, J. J. (2009). Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. *Animal*, 3, 1562-1569.
- Zebeli, Q., Aschenbach, J. R., Tafaj, M., Boguhn, J., Ametaj, B. N., and Drochner, W. (2012). Invited review: Role of physically effective fiber and estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 95, 1041-1056.
- Zebeli, Q., and Metzler-Zebeli, B. U. (2012). Interplay between rumen digestive disorders and diet-induced inflammation in dairy cattle. *Research in Veterinary Science*, 93, 1099-1108.
- Zened, A., Enjalbert, F., Nicot, M. C., and Troegeler-Meynadier, A. (2013). Starch plus sunflower oil addition to the diet of dry dairy cows results in a trans-11 to trans-10 shift of biohydrogenation. *Journal of Dairy Science*, 96, 451-459.
- Zhou, X., Zeitz, J., Meile, L., Kreuzer, M., and Schwarm, A. (2015). Influence of pH and the degree of protonation on the inhibitory effect of fatty acids in the ruminal methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* strain M1. *Journal of Applied Microbiology*, 119, 1482-1493.
- Zhu, H., Fievez, V., Mao, S., He, W., and Zhu, W. (2016). Dose and time response of ruminally infused algae on rumen fermentation characteristics, biohydrogenation and Butyrivibrio group bacteria in goats. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7, 22.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 FERMENTACIÓN *IN VITRO*

Se realizaron varios experimentos utilizando en todos ellos diferentes técnicas de fermentación ruminal *in vitro*. En tres experimentos se usó la técnica de simulación de la fermentación ruminal (RUSITEC) en fermentadores de flujo semicontinuo. En los otros estudios se utilizó la técnica de digestibilidad *in vitro* empleando bolsitas de material sintético poroso y un fermentador Daisy. Adicionalmente, en dos de los experimentos RUSITEC se utilizó la técnica de producción de gas para evaluar la actividad fermentativa de la microbiota de los fermentadores. Estas técnicas y su forma de aplicación se describen a continuación.

3.1.1 Técnica de la digestibilidad *in vitro*

La digestibilidad ruminal *in vitro* se determinó mediante el método de [Goering y Van Soest \(1970\)](#) adaptado a la tecnología propuesta por [ANKOM Technology Corporation \(2017b\)](#). Además, las incubaciones en líquido ruminal diluido tuvieron una duración de 24 h, mientras que en el método original de digestibilidad *in vitro* los alimentos se incuban en líquido ruminal durante 48 h.

3.1.1.1 Aparato y método

El aparato ANKOM DAISY ([Spanghero y col., 2010](#)) es un incubador que contiene cuatro recipientes (vasijas) de vidrio de 4 L de capacidad, cada uno de los cuales constituye una unidad de fermentación ruminal *in vitro*. Estas vasijas rotan lentamente dentro de la cámara de incubación que mantiene la temperatura a 39 °C. Las vasijas se purgan con CO₂, se llenan con un medio de cultivo (1600 mL/vasija), se inoculan con líquido ruminal (400 mL/vasija) y se les inserta un separador vertical de plástico que las divide en dos secciones donde se distribuyen las bolsas (ANKOM 57) en las que se ha pesado una muestra del material sometido a la digestión. Las bolsas ANKOM 57 están confeccionadas con un material sintético y poroso (25 µm de tamaño de poro) y tienen unas dimensiones de 45 x 55 mm. El sustrato a incubar se desecó en estufa de aire forzado (a 70 °C) y fue pulverizado en un molino de martillos tipo Culatti provisto

con una criba de 1 mm. Una muestra del sustrato molido (250 mg) se pesó en el interior de una bolsa, que se cerró mediante termosellado y se colocó en el interior de la vasija de fermentación. En cada vasija se introdujeron 20 bolsas, cinco para cada uno de los cuatro alimentos usados como sustratos de fermentación: heno de alfalfa, heno de gramíneas, paja y fibra de pulpa de remolacha. Estos cuatro alimentos utilizados fueron elegidos considerando su composición química, en particular la composición y características de la pared celular (fibra), para establecer el efecto de los tratamientos experimentales sobre la digestibilidad de cada uno de ellos. Una vez insertadas las bolsas y dosificado el líquido ruminal (inóculo) diluido en el medio de cultivo, las vasijas se cerraron con una tapa hermética que dispone de una válvula que permite la salida de los gases. Las vasijas se introdujeron en la incubadora Daisy y se llevó a cabo una incubación por un periodo de 24 h. Transcurrido este tiempo se abrieron las vasijas de fermentación, se retiraron las bolsas y luego se lavaron, primero bajo un flujo de agua y a continuación en una lavadora automática (ciclo de aclarado en agua fría durante 20 min). Tras el lavado, las bolsas se dejaron secar durante un mínimo de 48 h en estufa de ventilación forzada a 60 °C antes de ser pesadas. Posteriormente, se realizó una extracción con una disolución de detergente neutro ([Van Soest y col., 1991](#)) a 100 °C durante 1 h. Finalmente, las bolsas se secaron para determinar la desaparición de materia seca, a partir de la cual se calculó la digestibilidad *in vitro* del alimento.

En cada incubador pueden colocarse 4 vasijas. Cuando, en algún estudio, se necesitó un número inferior de vasijas, se incluyeron vasijas adicionales (con agua y sin bolsas) para ocupar todas las posiciones disponibles y asegurar el adecuado funcionamiento del sistema de rotación.

3.1.1.2 Estudios de digestibilidad *in vitro*

Se realizaron varios estudios de digestibilidad *in vitro* utilizando en todos ellos la técnica descrita anteriormente. En todos los casos los alimentos incubados fueron los cuatro mencionados en el apartado anterior (heno de alfalfa, heno de gramíneas, paja y fibra de pulpa de remolacha). El diseño experimental de cada estudio será descrito más detalladamente en un capítulo posterior (4.1).

En algunos de estos estudios se utilizó líquido ruminal de ovejas canuladas en el rumen como inóculo para las incubaciones, mientras que en otros estudios las vasijas se inocularon con líquido ruminal de novillos canulados en el rumen y alimentados con raciones con diferente proporción de forraje y concentrado.

Los tratamientos experimentales fueron diferentes en cada estudio, pero básicamente consistieron en variaciones en las condiciones de incubación para provocar cambios en el pH o en el medio de cultivo, con el objeto de determinar los efectos de dichos cambios sobre la digestibilidad de cada alimento incubado. Así, en algunos de los estudios se cambió el pH en el medio de cultivo utilizando diferentes disoluciones amortiguadoras, con variaciones en su composición (bicarbonato o fosfato/citrato) para conseguir distintos niveles de pH durante las incubaciones. En otros estudios, al medio de cultivo se añadieron directamente (no en las bolsas) o bien heno de hierba o bien harina de cebada para simular las condiciones de fermentación en el rumen que prevalecen cuando el animal consume un forraje o un concentrado, respectivamente. Finalmente, en uno de los estudios se utilizaron fuentes de inóculo correspondientes a líquido ruminal procedente de novillos alimentados con raciones con diferente ratio forraje:concentrado (100:0, 50:50 y 20:80), con el objetivo de analizar el efecto del inóculo sobre la digestibilidad de cada uno de los alimentos.

En todas las incubaciones, el tratamiento control consistió en una vasija inoculada con el mismo líquido ruminal que el resto de tratamientos, sin añadir ningún sustrato (heno o cebada), y usando un medio de cultivo estándar ([Menke y Steingass, 1988](#)) con el que se mantiene un pH en torno a la neutralidad ($\text{pH} \approx 7$) y cuya composición se describe a continuación.

3.1.1.3 Medio de cultivo control

El medio de cultivo estuvo compuesto por agua destilada en la que se diluyeron y se mezclaron disoluciones con sales minerales, una disolución amortiguadora, una disolución reductora y otra de resazurina. La preparación del medio se realizó en condiciones de anaerobiosis mediante la saturación de la mezcla con CO_2 ([Menke y Steingass, 1988](#); [Theodorou y col., 1994](#)). Las cantidades (volumen) de cada disolución utilizadas para preparar un litro de medio de cultivo se presentan a continuación.

A 475 mL de agua destilada se añadió inicialmente la solución de macroelementos, compuesta por 1,355 g de Na_2HPO_4 (Lab. CARLO ERBA), 1,472 g de KH_2PO_4 (Lab. CARLO ERBA) y 0,142 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lab. CARLO ERBA) disueltos en 237,5 mL de agua destilada. La solución de oligoelementos estuvo compuesta por 16 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Lab. CARLO ERBA), 12 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Lab. MERCK), 1 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Lab. SCHARLAU) y 1 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Lab. MERCK) disueltos en 1,2 mL de agua destilada.

Posteriormente se añadió la solución amortiguadora preparada con 0,950 g de $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ (Lab. CARLO ERBA) y 8,313 g de NaHCO_3 (CARLO ERBA) disueltos en 237,5 mL de agua destilada. La disolución de resazurina ($\text{C}_{12}\text{H}_6\text{NNaO}_4$ – Lab. PANREAC) se mezcló a razón de 1 mg de resazurina en 1,2 mL de agua destilada. Finalmente, se incorporó la solución reductora compuesta por 0,297 g de clorhidrato de L-cisteína monohidratado ($\text{C}_3\text{H}_8\text{ClNO}_2\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$, Lab. MERCK), 1,9 mL de NaOH 1 N (Lab. CARLO ERBA) y 0,297 g de sulfuro de sodio ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, Lab. CARLO ERBA) disueltos en 47,5 mL de agua destilada.

Las disoluciones se mezclaron, homogeneizaron y calentaron a 39 °C de temperatura, al mismo tiempo que se gaseó con CO_2 hasta obtener un cambio de coloración a rosado brillante (al cabo de aproximadamente 2 h), que indicó la saturación del medio con CO_2 .

3.1.2 Sistema de fermentadores de flujo semicontinuo (Rusitec)

Se utilizaron 16 vasijas de fermentación de un sistema de simulación de la fermentación ruminal construido según el diseño desarrollado por [Czerkawski y Breckenridge \(1977\)](#) y conocido como RUSITEC (RUmen Simulation TEChnique).

3.1.2.1 Descripción del aparato

El sistema constó de dos unidades, cada una con ocho fermentadores, que permanecieron sumergidos (hasta un 80 % de la altura) en un baño de agua a 39 °C. Cada fermentador es una vasija cilíndrica de 1 L de capacidad (650 mL de volumen efectivo), que puede cerrarse herméticamente mediante una tapa provista de tres orificios. Uno de los orificios sirve para la infusión permanente de una disolución amortiguadora (saliva artificial) mediante el uso de una bomba

peristáltica. Otro de los orificios está conectado, a través de un tubo impermeable a los gases, a un matraz cónico Kitasato donde se recoge el efluente que rebosa del fermentador. A su vez, el vástago lateral del matraz está conectado en su parte superior a una bolsa hermética (Tecobag, Tesseraux Container GmbH, Alemania) donde se acumulan los gases producidos durante la fermentación. El tercer orificio de la tapa dispone de un tapón o válvula que puede ser removido y permite el acceso al contenido de la vasija y la obtención de muestras del mismo. Dentro de cada vasija se encuentra un contenedor de plástico perforado donde se colocan las bolsas de nailon en las que previamente se ha pesado el alimento que se va a incubar (sustrato de fermentación). Dicho contenedor está unido mediante un eje rígido, que atraviesa la tapa de la vasija por el centro, a un motor que hace que el contenedor mantenga un movimiento cíclico ascendente-descendente en el interior de la vasija (cinco ciclos completos por minuto). De esta manera se produce una agitación continua del medio de fermentación y se fuerza al contenido líquido de la vasija a pasar a través del material incubado en cada movimiento.

3.1.2.2 Manejo del sistema

En cada experimento realizado con el RUSITEC se distinguen dos periodos: uno inicial donde se realiza la inoculación del sistema y la adaptación de los microorganismos ruminales a las condiciones experimentales, y un periodo de muestreo, en el que se determinan los principales parámetros de fermentación y el crecimiento microbiano.

Esquema del cronograma de actividades en el manejo del RUSITEC

Periodo de Adaptación		Periodo de mediciones y toma de muestras			
Día	Actividad	Día	Actividad	Día	Actividad
1	Inoculación	8	- pH - Desaparición sustrato - AGV, lactato y amoníaco - Gas y metano	15	- pH - Desaparición sustrato - AGV, lactato y amoníaco - Gas y metano
2	Adaptación	9	- pH - Desaparición sustrato - AGV, lactato y amoníaco - Gas y metano	16	- pH - Desaparición sustrato - AGV, lactato y amoníaco - Gas y metano
3	Adaptación	10	- pH - Desaparición sustrato - AGV, lactato y amoníaco - Gas y metano - Marcaje con ^{15}N	17	- pH - Desaparición sustrato - AGV, lactato y amoníaco - Gas y metano
4	Adaptación	11	- Infusión con ^{15}N	18	
5	Adaptación	12	- Infusión con ^{15}N	19	
6	Adaptación	13	- Muestras para proteína microbiana	20	
7	Adaptación	14		21	- Muestras para perfil de ácidos grasos de cadena larga

3.1.2.2.1 Inóculo, inoculación y fase de adaptación

La fase de adaptación se inicia el primer día de cada prueba, cuando las vasijas se inocularon con 400 mL de fluido ruminal mezclados con 250 mL de saliva artificial. La composición de esta saliva artificial fue la descrita por [McDougall \(1948\)](#), conteniendo por L de saliva: 9,7 g NaHCO_3 , 3,7 g Na_2HPO_4 , 0,47 g NaCl , 0,57 g KCl , 0,053 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0,128 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Además, en una de las bolsas se pesaron 80 g de contenido ruminal una vez extraído el líquido ruminal mediante presión, tal y como se describe en el siguiente apartado. Las muestras de digesta ruminal se obtuvieron de cuatro ovejas de raza merina justo antes de proceder con la alimentación matinal de los animales. Se mezclaron las muestras extraídas de las cuatro ovejas y el material se filtró a través de dos capas de gasa, recogiendo separadamente las dos fracciones resultantes, sólida y líquida, en termos que permiten mantener la temperatura y

evitar el contacto con el aire mientras se transportan al laboratorio. Una vez en el laboratorio, en cada vasija se vertieron 250 mL de saliva artificial ([McDougall, 1948](#)), y tras ser pre-calentadas hasta una temperatura de 39 °C, se añadieron los 400 mL del inóculo líquido. Como inóculo sólido se usó el material que quedó retenido en las gasas usadas como filtro. Este material se pesó (80 g) dentro de una bolsa de nailon (100 µm diámetro de poro). A su vez, en otra bolsa similar se pesaron 15 g de materia seca (MS) del alimento a incubar. Ambas bolsas se cerraron con un cordón de nailon para evitar la salida del material, y se remojaron en el contenido líquido de la vasija, para eliminar el aire de dentro de la bolsa y facilitar la colonización del alimento por los microorganismos ruminales. Posteriormente las bolsas se pusieron dentro del contenedor perforado, y este a su vez se introdujo dentro de la vasija, que se cerró y se colocó (encajándola en su lugar y anclando el eje del contenedor de alimento al sistema de movimiento) dentro del baño de agua a 39 °C. Finalmente, se conectaron los tubos de saliva artificial y de salida del efluente.

A partir de este momento y hasta el fin de experimento, cada vasija recibió una infusión continua de la saliva artificial (pH = 8.4). Dicha infusión se realizó a un ritmo de 556 mL/día, equivalente a una tasa de dilución del 3,6 %/h.

Las bolas de nailon con contenido ruminal (inóculo sólido) permanecieron durante 24 h dentro del fermentador. Al cabo de este tiempo, estas bolsas se sustituyeron por sendas bolsas que ya contenían el alimento bajo experimentación. Posteriormente, y durante todo el experimento, las bolsas con alimentos se reemplazaron después de transcurridas 48 h dentro de la vasija de fermentación. Así, en todo momento cada vasija contenía dos bolsas con el alimento incubado.

3.1.2.2.2 Rutina diaria de trabajo

El manejo del sistema durante cada uno de los días de adaptación posteriores al día de inoculación se iniciaba con el apagado del motor de agitación, seguido por el gaseado con 2 L de N₂ con el fin de desplazar los gases producidos durante la fermentación hasta la bolsa destinada a su recogida, la cual se cerró y se retiró del sistema. A continuación, se desconectaron los tubos de la saliva y del efluente, se extrajo la vasija del baño y se ubicó en otro baño de agua

(39 °C), donde el eje que sostiene el contenedor perforado para el alimento se desplazó varias veces para homogenizar su contenido antes de abrir la vasija. Posteriormente, se retiró dicho contenedor y se determinó el pH (pH-metro Basic 20, Crison) del contenido de la vasija. Luego se abrió el contenedor del alimento sólido para extraer la bolsa de alimento que llevaba 48 h dentro de la vasija (el segundo día de incubación se extrajo la bolsa que contenía contenido ruminal sólido). La bolsa de alimento extraída se sometió a dos lavados sucesivos con 40 mL de saliva artificial cada uno. Los 80 mL del líquido procedente de estos dos lavados se emplearon para impregnar la bolsa de alimento que iba a ser introducida a continuación en la vasija. Una vez que la nueva bolsa de alimento estuvo bien empapada se introdujo en el contenedor del alimento sólido y el resto del líquido de lavado se vertió en la vasija. Finalmente, se cerró la vasija y se colocó dentro del sistema.

Diariamente, el efluente recogido en cada matraz se pesó y se descartó. Antes de volver a colocar el matraz Kitasato en su sitio se añadieron 20 mL de ácido sulfúrico al 20 %. Una vez que todas las vasijas fueron colocadas en el sistema, se conectaron los tubos de la saliva y del efluente, se gaseó cada vasija con 2 L de N₂, se conectaron las bolsas de recogida de gases y se puso en marcha el motor.

Este manejo se repitió cada día del periodo de adaptación y también sirvió de rutina base durante el periodo de mediciones, pero permitiendo los cambios que habilitaron la recolección de muestras, tal como se explicará más adelante.

3.1.2.2.3 Periodo de mediciones y toma de muestras

Tras el periodo de adaptación de 7 días, se inició el periodo de mediciones y de recolección de muestras, que tuvo una duración de 14 días, e incluyó los muestreos y determinaciones que se exponen a continuación.

3.1.2.2.3.1 pH

Todos los días antes de reemplazar la bolsa con contenido alimenticio se registró el pH del contenido líquido de cada fermentador.

3.1.2.2.3.2 Desaparición de sustrato incubado

La desaparición de MS del sustrato de la bolsa tras 48 h de incubación fue determinada a partir del peso del residuo de incubación (peso de la bolsa retirada tras la incubación, lavada y secada, descontando el peso de la bolsa vacía). Inmediatamente después de la recolección diaria de bolsas de nailon, estas se lavaron dos veces en 40 mL de saliva artificial y luego se lavaron a mano bajo un flujo de agua fría del grifo. Posteriormente se determinó la materia seca remanente mediante el secado en una estufa a 60 °C durante 48 h. Después las muestras fueron reservadas para el análisis de la composición química.

3.1.2.2.3.3 Productos finales de la fermentación en el efluente

En los días 1, 2, 3, 8, 9 y 10 de este periodo se determinó el volumen de efluente producido. Para ello los efluentes líquidos se recogieron en los matraces Kitasato que contenían 20 mL de H₂SO₄ (20 % de pureza). Del total de efluente recogido se tomaron muestras para el análisis de ácidos grasos volátiles (5 mL), lactato (5 mL) y amoníaco (5 mL). Estas muestras se congelaron a -20 °C y se almacenaron hasta su posterior análisis.

3.1.2.2.3.4 Producción de gas de fermentación

En los días 1, 2, 3, 8, 9 y 10 también se determinó la producción total de gas, que fue recogido diariamente utilizando las bolsas herméticas referidas previamente. El volumen de gas contenido en las bolsas se determinó con un medidor de gas de tipo tambor (modelo TG1; Ritter Apparatebau GmbH, Alemania). Tras la medición del volumen de gas, se recogió una muestra de gas de cada bolsa utilizando tubos de ensayo Vacutainer® de 10 mL para la posterior determinación de metano.

3.1.2.2.3.5 Síntesis de proteína microbiana

Para la determinación de proteína microbiana fue necesario marcar, antes de realizar el muestreo, el nitrógeno microbiano usando ¹⁵N. Para ello, cuatro días antes del muestreo se administró una dosis de 1,8 mg de ¹⁵N (¹⁵NH₄Cl enriquecido, 98 %; trazador SA, Madrid, España) dentro de cada vasija de fermentación para marcar de manera instantánea el amoníaco disponible. Además, durante los tres días siguientes se añadió diariamente una solución de

$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ a la saliva artificial a razón de 4 mg ^{15}N / g N total en el sustrato incubado, con el propósito de infundir continuamente ^{15}N a cada una de las vasijas.

En el día 6 de los periodos de recolección, se tomaron muestras de digesta de los fermentadores para determinar la síntesis de proteína microbiana mediante el método de ^{15}N , según los procedimientos descritos por [Carro y Miller \(1999\)](#) y [Giraldo y col. \(2007\)](#). Para ello, se obtuvo una muestra compuesta por una mezcla del residuo de incubación presente en la bolsa a retirar (incubada durante las últimas 48 h) y el efluente recogido de la misma vasija. En este caso, el efluente se recogió usando 5 mL de una solución saturada de cloruro de mercurio (en lugar del ácido sulfúrico habitual), con el fin de detener el crecimiento microbiano sin producir una lisis de los microorganismos. Los efluentes y los residuos de incubación se mezclaron usando una batidora eléctrica durante 1 min.

Una vez obtenida la mezcla de digesta (efluente + residuo de incubación) se tomó una muestra de 200 g que se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se liofilizó, determinando su contenido en MS. La digesta sobrante se filtró dos veces a través de tres capas de tela de nailon ($40\text{ }\mu\text{m}$, tamaño de poro). El filtrado obtenido se centrifugó (13.900 rpm durante 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) y el sedimento obtenido fue congelado y liofilizado. Este sedimento se consideró una muestra de masa de origen bacteriano representativa de la microbiota presente en los fermentadores. El sedimento aislado en estas condiciones de filtración y centrifugación contiene casi exclusivamente células bacterianas. Sin embargo, como simplificación se utilizará el término “proteína microbiana” para referirnos a la fracción estimada a partir de dicho sedimento.

Las muestras liofilizadas (1 g del total de la digesta o 0,08 g de sedimento bacteriano) se utilizaron para las determinaciones de nitrógeno no amoniacal (NNA) y enriquecimiento con ^{15}N ([Barrie y Workman, 1984](#)). Las muestras para NNA se prepararon para el análisis de micro-Kjeldahl utilizando el procedimiento de [Firkins y col. \(1987\)](#). En el caso de digesta total, el nitrógeno amoniacal fue retirado mediante la adición de NaOH 1 M (9 mL / muestra) seguida de una incubación a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 h.

El último día de cada periodo de muestreo, se obtuvieron las muestras destinadas al análisis de ácidos grasos de cadena larga (AGCL), que se prepararon mezclando 30 mL del contenido líquido de los fermentadores, 1,5 g de los residuos de la bolsa incubada durante 48 h, y 1,5 g de los residuos de la bolsa que se había incubado solo durante 24 h. Las muestras fueron congeladas a -80°C y liofilizadas. Los ácidos grasos se analizaron por cromatografía de gases después de la extracción de grasa y de metilación. Para la extracción de grasa se utilizó una muestra de 0,5 g previamente molida y homogenizada por medio de un mortero de cerámica.

3.1.3 Actividad fermentativa

En dos de los experimentos RUSITEC, el líquido remanente en los vasos fermentación fue utilizado para evaluar la actividad fermentativa de la microbiota de acuerdo con la metodología descrita por [García-González y col. \(2010\)](#). El líquido de cada fermentador RUSITEC se usó como inóculo y medio de incubación para cultivos en serie (cultivos no renovados de microorganismos ruminales), donde se midió la respuesta en la producción de gas después de diferentes tiempos de incubación. La actividad de fermentación del líquido contenido en cada vasija se determinó usando tres sustratos: celulosa, almidón y la misma dieta utilizada en el tratamiento de control de la prueba RUSITEC. Después de lavar con saliva artificial las bolsas y devolver el líquido de lavado al recipiente, se dosificaron 50 mL del contenido líquido de cada vasija en botellas de suero de 120 mL. Cada botella contenía 500 mg de uno de los sustratos descritos anteriormente, previamente triturado a través de una malla de 1 mm. Las botellas se gasearon con CO_2 y la dosificación se realizó bajo anaerobiosis con el fin de eliminar el O_2 y conseguir una atmósfera de CO_2 en el espacio de cabeza. Las botellas se sellaron con tapones de goma y cápsulas de aluminio y se colocaron en una incubadora a 39°C . La producción de gas se midió a las 2, 4, 6, 8, 12, 22, 32, 46, 72, 96 y 120 horas, utilizando la técnica del transductor de presión descrita por [Theodorou y col. \(1994\)](#).

3.2 PROCESADO DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS QUÍMICOS

3.2.1 Metano

En las muestras de gas se determinó la concentración de metano mediante cromatografía de gases ([García-Gonzalez y col., 2008](#)). Para ello se usó una columna capilar de sílica fundida STABILWAX-DA marca RESTEK (fase polar; polietilenglicol Crossbond ® de ácido desactivado por Carbowax ® para compuestos ácidos) de 30 m de longitud, 0,53 mm de diámetro interno, 1 µm de espesor de la película y con capacidad para soportar temperaturas entre 40 y 250 °C; y un detector de ionización de llama FID (Marca Agilent HP modelo 3890). Los análisis se realizaron en un equipo de cromatografía de gases marca Shimadzu GC Modelo 2010, con un inyector Shimadzu AOC-20i y un espectrómetro Shimadzu GCMSQP2010.

La cuantificación CH₄ se hizo usando como patrón externo una mezcla de gases compuesta por CH₄ (10 %), N₂ (25 %), H₂ (5 %) y CO₂ (60 %). El He se utilizó como gas portador, que se graduó a un flujo de 24 mL/min.

3.2.2 Amoníaco

En función de las muestras obtenidas se realizaron dos tipos de análisis de amoníaco, uno por un método colorimétrico y otro por destilación. El análisis de amoníaco por colorimetría se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por [Weatherburn \(1967\)](#). Este método está basado en la reacción del NH₃ presente en la muestra con fenol e hipoclorito sódico, de tal forma que se produce indofenol. El indofenol es un compuesto de color azul cuya lectura espectrofotométrica se realiza a una longitud de onda de 625 nm. Para este análisis, las muestras se descongelaron y se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se diluyó 50 veces con agua destilada. De esta dilución se tomó 1 mL y se mezcló con 5 mL de una solución formada por fenol (10 g/L) y nitroprusiato sódico (50 mg/L). Tras mezclar en un agitador durante 20 s se añadieron 4 mL de una solución compuesta por NaOH (5 g/L) y NaClO (8,4 mL/L), se agitó de nuevo y se introdujo en un baño con agua a 39 °C durante 15 min. Transcurrido ese tiempo, se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (Milton-Roy Company Spectronic 20D). Para la realización de

la curva patrón se utilizó una solución de sulfato amónico 50 mM (0,6607 g/100 mL de agua destilada).

La determinación de amoníaco por destilación se realizó únicamente en aquellas muestras en las que posteriormente se determinó su enriquecimiento en ^{15}N . Estas muestras se descongelaron a 4 °C y se centrifugaron a 20.000 x g durante 20 min a 4 °C. A continuación, se tomaron 80 mL del sobrenadante y se sometieron a una destilación directa con NaOH (Kjeltec System 1002, Tecator). El destilado se recogió sobre 25 mL de una solución de ácido bórico (0,5 %) y se valoró con H_2SO_4 0,2 N. Una vez valoradas las muestras, el destilado se acidificó en exceso con 0,5 mL de H_2SO_4 2 N, para prevenir pérdidas de N en forma de amoníaco y una posible contaminación microbiana. A continuación, las muestras se evaporaron a 55 °C hasta que su concentración en N fue de 3 mg/mL, concentración necesaria para un adecuado análisis de su enriquecimiento en ^{15}N .

3.2.3 Ácidos grasos volátiles

Las muestras que se recogieron para analizar la concentración en ácidos grasos volátiles (AGV) se descongelaron a 4 °C y se centrifugaron a 15.500 x g durante 10 min. Para hacer la determinación de AGV (acético, propiónico, butírico) se pipetearon 0,8 mL del sobrenadante obtenido tras la centrifugación de la muestra de líquido ruminal, a los cuales se le añadieron 0,5 mL de una solución con 20 g/L de ácido metafosfórico y 4 g/L de ácido crotónico (usado como estándar interno) en ácido clorhídrico 0,5 N. La mezcla obtenida se dejó reposar durante 12 h en frío (4 °C) y se centrifugó en las condiciones anteriormente mencionadas antes de proceder a su trasvase a viales de cromatografía.

Para el análisis cromatográfico se usó una columna semicapilar, TR-FFAP, 30 m × 0,53 mm × 1 µm (Supelco, Barcelona, España), un cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL (con temperaturas de 140 °C en la columna, de 250 °C en el inyector y de 250 °C en el detector) equipado con un inyector automático, y un detector FID de ionización de llama ([García-González y col., 2008](#)).

Se utilizó una disolución patrón con ácido acético (C2), ácido propiónico (C3), ácido butírico (C4), ácido isobutírico (iC4), ácido valérico (C5), ácido isovalérico (iC5) y ácido caproico (C6) para establecer los tiempos de retención en

columna y elución de cada ácido. Adicionalmente se prepararon cuatro diluciones de estos ácidos para realizar la curva de calibración.

3.2.4 Lactato

La determinación de la concentración de ácido láctico en las muestras de líquido de fermentación se realizó siguiendo la técnica descrita por [Taylor \(1996\)](#). El ácido láctico presente en la muestra se hace reaccionar con parafenilfenol y sulfato de cobre (CuSO_4) en presencia de H_2SO_4 y calor. Como resultado se obtiene un compuesto que absorbe la luz a 570 nm.

Las muestras de los fermentadores se descongelaron y se centrifugaron a $10.000 \times g$ durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se diluyó 50 veces con agua destilada. De esta dilución se tomaron 500 μL y se mezclaron con 3 mL de H_2SO_4 . Tras mezclar en un agitador durante 20 s se incubó en un baño a 100 °C durante 10 min. Posteriormente se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente (25 °C) y se añadieron 50 μL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 4 %. Se agitó durante 20 s y se añadieron 100 μL de parafenilfenol al 1,5 % en etanol al 95 %. Tras agitar durante otros 20 s, se introdujo en un baño de agua a 30 °C durante 60 min. Transcurrido ese tiempo, se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (Ultrospec 500 pro, Amersham-Biosciences®, Barcelona, España) a una longitud de onda de 570 nm. Para la realización de la curva patrón se utilizaron disoluciones de ácido láctico de concentración conocida.

3.2.5 Análisis de la composición química

El contenido en MS de las muestras se determinó mediante desecación a 100 °C en estufa de ventilación forzada hasta alcanzar un peso constante (método AOAC 934.01)([AOAC, 1999](#)). Las muestras que presentaban un alto porcentaje de humedad (digesta sólida, líquida y total; sedimentos bacterianos) se liofilizaron antes de su secado final en estufa.

El contenido en cenizas se determinó por calcinación de las muestras en un horno de mufla a 550 °C durante 12 h (método AOAC 942.05) y el contenido en materia orgánica (MO) se calculó por diferencia.

El contenido en FND y FAD se analizó siguiendo la técnica secuencial descrita por [Van Soest y col. \(1991\)](#), adoptando las modificaciones propuestas por

[ANKOM Technology Corporation \(2017a\)](#). El aislamiento de cada una de las fracciones se realizó mediante la extracción secuencial con un detergente neutro (método AOAC 2002.04) y un detergente ácido (método AOAC 973.18). Las muestras se introdujeron en bolsas de poliéster (Ankom #57).

El extracto etéreo fue determinado por tecnología de filtro de mangas (método AOCS Am5 04), utilizando un sistema de extracción Ankom XT15 (Ankom®, EE.UU.) ([AOCS, 2005](#)).

El contenido en N se determinó mediante el método Kjeldahl (métodos AOAC 984.13 y 2001.11)([AOAC, 1999](#)), utilizando un equipo de destilación Kjeltect System 1002 (Tecator). En aquellas muestras en las que posteriormente se determinó su enriquecimiento en ^{15}N el proceso de destilación se realizó tal y como se describe en el apartado de análisis de amoníaco por destilación. El contenido en proteína bruta se obtuvo multiplicando el contenido en N de la muestra por el factor de conversión 6,25.

La determinación del N no amoniacal (NNA) se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por ([Firkins y col., 1992](#)), mediante la cual el amoníaco es eliminado de las muestras antes de analizar su contenido en N. Para ello, las muestras (1 g) se humedecieron con 6 mL de NaOH 1 N y tras comprobar que se alcanzó un pH superior a 10, se mantuvieron en una estufa a 60 °C durante 16 h. Una vez que el amoníaco hubo sido eliminado, se determinó el contenido en N (NNA) de las muestras tal y como se ha descrito anteriormente.

3.2.6 Síntesis de proteína microbiana

Como se mencionó anteriormente la síntesis de proteína microbiana se determinó a partir del marcaje isotópico con ^{15}N del nitrógeno microbiano.

3.2.6.1 Análisis del enriquecimiento en ^{15}N

Los análisis de enriquecimiento de ^{15}N se realizaron por espectrometría de masas de relación isotópica (VG Prisma II, Middlewich, Reino Unido) conectada en serie con un analizador elemental CNHS-O (DUMAS-style N analyser ES 1108, Carlo Erba Instruments, Milán, Italia). Antes del análisis, el NNA obtenido en el micro-Kjeldahl y recogido en ácido bórico (4 %) se mezcló con H_2SO_4 (0,2 N), y la muestra resultante se acidificó con 0,5 mL de H_2SO_4 (2 N) y se evaporó hasta

alrededor de 0,5 mL de volumen en una placa calefactora a 55 °C. Por último, el residuo seco fue disuelto en agua destilada (1,5 mL) para obtener una solución con una cantidad de N adecuada para el análisis de ^{15}N .

La síntesis de proteína microbiana diaria fue estimada a partir de los siguientes cálculos. En primer lugar, la proporción de NNA de origen microbiano (mg N microbiano/mg N digesta) fue estimado para cada fermentador dividiendo el enriquecimiento de ^{15}N (% átomos en exceso) en la digesta total por el enriquecimiento del correspondiente sedimento bacteriano (previamente ambos enriquecimientos habían sido corregidos descontando en enriquecimiento natural, que se asumió igual a 0,366 %). En segundo lugar, la producción de N microbiano en cada vasija (mg N/d) se calculó multiplicando la producción total de NNA (mg MS digesta total / d x mg NNA/g MS digesta total) por la proporción de N microbiano en la digesta. Finalmente, el resultado se multiplicó por 6,25 para estimar la síntesis diaria de proteína microbiana. La cantidad de materia orgánica fermentada diariamente (g MOF/d) se calculó a partir de la desaparición de la materia orgánica a las 48 horas de incubación y el contenido en MO del sustrato incubado.

3.2.7 Análisis de ácidos grasos de cadena larga (AGCL)

Se analizó el contenido de ácidos grasos de cadena larga en las muestras de alimento y en las de digesta de las vasijas del RUSITEC. Este análisis comprendió tres pasos: extracción, derivatización y determinación mediante cromatografía de gases masas.

3.2.7.1 Extracción

Para la obtención de digesta, el último día del periodo experimental se tomaron 1,5 g del residuo de las bolsas de 48 h de incubación, 1,5 g del residuo de las bolsas de 24 h y 30 mL de líquido sobrenadante en cada una de las vasijas de fermentación. Estas tres porciones se mezclaron para obtener una muestra representativa de la digesta ruminal en cada vasija, la cual fue liofilizada. Las muestras secas de alimento y de digesta se homogeneizaron y se tomó una porción de 500 mg para la extracción de grasa.

Los lípidos se extrajeron según el método descrito por [Fellner y col. \(1995\)](#) con algunas modificaciones. Las muestras (500 mg) se molieron en un mortero de cerámica y se transfirieron a unos tubos de 10 mL con tapón de rosca. Se añadieron 20 µL de butil hidroxitolueno (antioxidante) y 500 µL de una disolución de patrón interno (20 mg de ácido heneicosanoico C21:0 diluido en 1 mL de cloroformo). Posteriormente se añadieron 5 mL de una mezcla de cloroformo y metanol (2:1, vol:vol) y 1 mL de agua destilada. Tras cada adición el tubo se agitó en un vortex durante 30 s. Al final, el contenido del tubo se homogeneizó mediante agitación durante 1 min y se centrifugó a 5.000 rpm durante 3 min a 30 °C. Después de la centrifugación, la capa de cloroformo se transfirió a un matraz de fondo redondo (250 mL) con una pipeta Pasteur. La adición de la mezcla de cloroformo y metanol y de agua destilada, y la posterior homogeneización, centrifugación y recuperación de la fase de cloroformo se repitió dos veces más. El cloroformo se evaporó hasta 1,5 mL en un rotavapor Büchi (a 45 °C) y el residuo se transfirió a un tubo eppendorf de 2 mL con tapón de rosca. A continuación, se realizó una nueva evaporación de solvente en un concentrador Speedvac durante 60 min. Finalmente, se dosificaron 100 µL de hexano y se gaseó con N₂ durante un tiempo suficiente para llenar el espacio vacío. Esta muestra se conservó a -30 °C bajo atmósfera de N₂ hasta su posterior análisis.

3.2.7.2 Derivatización

La derivatización (metilación) es el proceso químico mediante el cual los ácidos grasos contenidos en la muestra lipídica extraída son convertidos en sus correspondientes derivados ésteres de metilo, compuestos volátiles que pueden ser analizados por cromatografía de gases. La grasa extraída se sometió a derivatización mediante metanólisis alcalina catalizada de los glicéridos con metóxido de sodio (NaOCH₃) para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME).

La muestra de grasa extraída fue reconstituida mediante la adición de 300 µL de hexano y, tras una agitación vigorosa para recoger toda la grasa, se transfirió a un tubo de Pyrex de 10 mL con tapón de rosca. Se añadieron 2 mL de NaOCH₃ 0,5 M y se agitó el tubo en un vortex. A continuación, los tubos fueron

colocados en una estufa incubadora a 47 °C durante 10 min. Transcurrido ese tiempo se realizó otra homogeneización y se prolongó la incubación durante otros 20 min. Los tubos se extrajeron del incubador, se enfriaron a temperatura ambiente, y se añadieron 3 gotas de ácido acético glacial (100 % de pureza), 2 mL de agua ultrapura (Milli-Q), 2 mL de hexano y 0,5 g de sulfato de sodio anhidro. La muestra se homogeneizó después de cada una de estas adiciones. Finalmente, los tubos se centrifugaron (5.000 rpm a 30 °C durante 3 min) y se pipeteó una muestra de 1 mL de la fase superior (capa de hexano) que se transfirió a un vial para análisis mediante cromatografía de gases (GC).

3.2.7.3 Cromatografía de gases

La determinación del contenido de cada ácido graso se realizó mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, que permite identificar todos los compuestos volátiles presentes en las muestras. Este análisis se realizó utilizando un cromatógrafo Hewlett Packard 6890 GC, equipado con un inyector automático (HP 7683 Series inyector) y con un detector de masas selectivo (modelo Hewlett Packard 5973). Para la separación se utilizó una columna capilar TR-CN 100 de 100 m de longitud x 0,25 mm de diámetro interno x 0,20 µm de espesor de película (Teknokroma, Barcelona). La temperatura del inyector fue de 230 °C y la del detector 260 °C. La relación de flujo de He fue de 0,9 mL/min. Se inyectó 1 µL de la muestra en split 20:1. La rampa de temperatura del horno (columna) se inició con 50 °C manteniendo esa temperatura durante 1 min. Posteriormente la temperatura se aumentó a razón de 10 °C/min hasta 200 °C, y ésta temperatura se mantuvo durante 3 min. Transcurrido ese tiempo, la temperatura se aumentó a razón de 2 °C/min hasta alcanzar la temperatura final de 220 °C que se mantuvo durante 5 min.

La identificación de los picos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención con los obtenidos para una mezcla estándar de 37 FAME (Supelco 37 FAME componente Gato Mix N° 18919-1AMP) y ácido vaccénico (Supelco transvaccénico Cat. N ° 46.905-U), analizada en las mismas condiciones operativas de GC/MS, así como mediante la comparación de los espectros de masas con los datos disponibles en una biblioteca de masa espectral (Hewlett

Packard Willey 275). El contenido de cada ácido graso (AG) se expresa como mg a AG/100 mg del total de FAME.

3.2.7.4 Biohidrogenación

La biohidrogenación (BH) de AG de 18 C se calculó de acuerdo con la propuesta de [Wu y Palmquist \(1991\)](#) a partir de los cambios en las proporciones de C18:1, C18:2 y C18:3 en la digesta en relación con las proporciones originales en el alimento. Para ello, en primer lugar se calculó el porcentaje de cada AG sobre el total de AG con 18 C (pAG_i):

$$pAG_i = \frac{C18_i}{C18:0 + C18:1 + C18:2 + C18:3} \times 100$$

Este porcentaje se calcula tanto en el alimento $pAG_i^{alimento}$ como en la digesta $pAG_i^{digesta}$, a partir de los contenidos en cada AG que se hayan determinado. La tasa de biohidrogenación de cada AG_i de 18 C se calculó como:

$$\text{Biohidrogenación (BH}_i, \%) = 100 \times \left(1 - \frac{pAG_i^{digesta}}{pAG_i^{alimento}} \right).$$

Esta aproximación considera que los cambios en las proporciones de los ácidos grasos en el rumen debido a factores diferentes a la biohidrogenación no son significativos.

3.2.7.5 Biohidrogenación total

A partir de los coeficientes de biohidrogenación de cada ácido graso ($BH_{C18:1}$, $BH_{C18:2}$ y $BH_{C18:3}$ para los ácidos oleico, linoleico y linolénico, respectivamente) se calculó la biohidrogenación (BH) total:

$$\text{BH total} = \left(BH_{C18:1} \times pAG_{C18:1}^{alimento} / 100 \right) + \left(BH_{C18:2} \times pAG_{C18:2}^{alimento} / 100 \right) + \left(BH_{C18:3} \times pAG_{C18:3}^{alimento} / 100 \right) = \sum_{i=1}^{i=3} \left(BH_{C18:i} \times pAG_{C18:i}^{alimento} / 100 \right)$$

$$\begin{aligned}
 & \left(pAG_{C18:1}^{alimento} - pAG_{C18:1}^{digesta} \right) + \\
 \text{BH total} = & \left(pAG_{C18:2}^{alimento} - pAG_{C18:2}^{digesta} \right) + \sum_{i=1}^{i=3} \left(pAG_{C18:i}^{alimento} - pAG_{C18:i}^{digesta} \right) \\
 & \left(pAG_{C18:3}^{alimento} - pAG_{C18:3}^{digesta} \right)
 \end{aligned}$$

donde C18:1, C18:2 y C18:3 son los ácidos oleico, linoleico y linolénico, respectivamente.

3.3 BIBLIOGRAFIA

- ANKOM Technology Corporation. (2017a). ANKOM technology analytical methods. Retrieve from: <https://www.ankom.com/analytical-methods-support/fiber-analyzer-a2000>
- ANKOM Technology Corporation. (2017b). ANKOM Technology method 3: *In vitro* true digestibility using the DAISY" incubator. Retrieve from: https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method_3_Invitro_D200_D200I.pdf
- AOAC. (1999). *Official methods of analysis* (16th ed.). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- AOCS. (2005). AOCS Official methods, rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction, Method Am 5– 04. Urbana, IL, USA.
- Barrie, S., and Workman, C. T. (1984). An automated analytical system for nutritional investigations using N-15 tracers. *Spectroscopy International Journal*, 3, 439–447.
- Carro, M. D., and Miller, E. L. (1999). Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semi-continuous culture system (RUSITEC). *British Journal of Nutrition*, 82, 149-157.
- Czerkawski, J. W., and Breckenridge, G. (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (RUSITEC). *British Journal of Nutrition*, 38, 371-384.
- Fellner, V., Sauer, F. D., and Kramer, J. K. G. (1995). Steady-state rates of linoleic acid biohydrogenation by ruminal bacteria in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 78, 1815-1823.
- Firkins, J. L., Berger, L. L., Merchen, N. R., Fahey, G. C., Jr., and Mulvaney, R. L. (1987). Ruminal nitrogen metabolism in steers as affected by feed intake and dietary urea concentration. *Journal of Dairy Science*, 70, 2302-2311.
- Firkins, J. L., Weiss, W. P., and Piwonka, E. J. (1992). Quantification of intraruminal recycling of microbial nitrogen using nitrogen-15. *Journal of Animal Science*, 70, 3223-3233.
- García-González, R., González, J. S., and López, S. (2010). Decrease of ruminal methane production in RUSITEC fermenters through the addition of plant material from rhubarb (*Rheum spp.*) and alder buckthorn (*Frangula alnus*). *Journal of Dairy Science*, 93, 3755-3763.
- García-González, R., López, S., Fernández, M., Bodas, R., and González, J. S. (2008). Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 36-52.
- García-Gonzalez, R., López, S., Fernández, M., and González, J. S. (2008). Dose-response effects of *Rheum officinale* root and *Frangula alnus* bark on ruminal methane production *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 319-334.

- Giraldo, L. A., Tejido, M. L., Ranilla, M. J., and Carro, M. D. (2007). Effects of treatment by fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and microbial growth in fermentators. *Itea-Informacion Tecnica Economica Agraria*, 126-128.
- Goering, H. K., and Van Soest, P. J. (1970). Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications) *Agriculture Handbook No. 379*. Washington: ARS-USDA.
- McDougall, E. I. (1948). Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheeps saliva. *Biochemical Journal*, 43, 99-109.
- Menke, K. H., and Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28, 7-55.
- Spanghero, M., Berzaghi, P., Fortina, R., Masoero, F., Rapetti, L., Zanfi, C., Tassone, S., Gallo, A., Colombini, S., and Ferlito, J. C. (2010). Technical note: Precision and accuracy of *in vitro* digestion of neutral detergent fiber and predicted net energy of lactation content of fibrous feeds. *Journal of Dairy Science*, 93, 4855-4859.
- Taylor, K. (1996). A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 56, 49-58.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., and France, J. (1994). A simple gas-production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48, 185-197.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., and Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.
- Weatherburn, M. W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39, 971-971.
- Wu, Z., and Palmquist, D. L. (1991). Synthesis and biohydrogenation of fatty acids by ruminal microorganisms *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 74, 3035-3046.

4. PRUEBAS EXPERIMENTALES

- 4.1 Digestibilidad ruminal in vitro de forrajes bajo condiciones subóptimas de pH en los inóculos microbianos y en los medios de cultivo**
- 4.2 Efecto de la relación forraje/concentrado en la ración y del pH del medio de cultivo sobre el patrón de fermentación, la producción de metano y la biohidrogenación ruminal**
- 4.3 Efecto de la adición de aceites de oliva, girasol o linaza a la ración sobre el patrón de fermentación, la producción de metano y la biohidrogenación ruminal**
- 4.4 Efecto de la adición de aceites de girasol, pescado o algas al pienso sobre el patrón de fermentación, la producción de metano y la biohidrogenación ruminal**

4.1 DIGESTIBILIDAD RUMINAL *IN VITRO* DE FORRAJES BAJO CONDICIONES SUB-ÓPTIMAS DE PH EN LOS INÓCULOS MICROBIANOS Y EN LOS MEDIOS DE CULTIVO

4.1.1 INTRODUCCIÓN

Cuando el nivel de producción (ganancia de peso o producción de leche) es muy alto, la inclusión de alimentos fibrosos en las raciones, incluso de aquellos que son más digestibles, puede limitar la ingestión de energía ([Kaufmann, 1976](#)). Por este motivo, los sistemas intensivos de producción de rumiantes se basan en la utilización de raciones con una alta proporción de alimentos concentrados: cereales y concentrados proteicos. El consumo de raciones ricas en cereales con un alto contenido en hidratos de carbono no estructurales, rápidamente fermentables en el rumen, es un factor que aumenta la incidencia de acidosis ruminal, un problema muy común en los rebaños de producción lechera y en los cebaderos de terneros y corderos ([Krause y Oetzel, 2006](#)); ([Brown y col., 2006](#)). La producción, conservación y manejo de los alimentos concentrados es, en general, más asequible que las de los forrajes. Sin embargo, cuando los rumiantes consumen cantidades elevadas de carbohidratos no fibrosos de rápida fermentación, el pH ruminal desciende. A medida que disminuye el pH ruminal se producen cambios en las comunidades microbianas y se provoca una disminución de la digestión de la fibra ([Miller y Muntiferling, 1985](#)).

Por otro lado, el estudio del efecto del pH en condiciones *in vitro* ([Grant y Mertens, 1992a](#)) plantea ciertas dificultades, ya que para poder mantener los cultivos de microorganismos ruminales es preciso que el medio de cultivo incluya una disolución tampón con alta capacidad amortiguadora ([Menke y Steingass, 1988](#)), que ajuste el pH a valores muy próximos a la neutralidad (7,0). Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en el rumen, en los cultivos *in vitro* no actúan los principales mecanismos reguladores del pH: la absorción de AGV y el aporte de saliva ([Van Soest, 1994](#)). Por este motivo, si llega a producirse un descenso pronunciado del pH en los cultivos por la acumulación de AGV, es poco probable que se puedan recuperar las condiciones óptimas de fermentación. Aunque se ha evaluado la posibilidad de utilizar diversas disoluciones amortiguadoras del pH para simular las condiciones *in vivo* ([Elving y col., 1956](#));

([Grant y Mertens, 1992a](#)), con las disoluciones amortiguadoras utilizadas solo se observan pequeñas variaciones del pH. Por este motivo, con dietas ricas en concentrados las condiciones de fermentación *in vitro* se apartan considerablemente de las condiciones de fermentación imperantes en el rumen, pues el pH de la digesta en el rumen es uno de los factores que influye de manera significativa sobre la microbiota y el patrón de fermentación ruminal ([Lana y col., 1998](#)) y, consecuentemente, sobre la degradación de la pared celular vegetal. Por otra parte, bajo condiciones *in vitro*, la dieta de los animales donantes de digesta ruminal también puede determinar la composición microbiana del inóculo utilizado para las incubaciones y, en consecuencia, el patrón de fermentación ([Ottou y Doreau, 1996](#)).

El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos del inóculo y de condiciones subóptimas del pH en el medio de cultivo sobre la digestibilidad *in vitro* de alimentos con alto contenido en fibra. Para obtener inóculos con diferente composición microbiana, los animales de los que se obtuvo la digesta ruminal recibieron dietas con diferentes proporciones de forraje y alimento concentrado. Para inducir condiciones subóptimas de pH en los cultivos de microorganismos ruminales, se añadieron distintos sustratos al medio de fermentación o se modificó la composición de la disolución amortiguadora.

4.1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron cuatro estudios de digestibilidad *in vitro* utilizando el fermentador DAISY (ANKOM) ([Wilman y Adesogan, 2000](#); [Adesogan, 2005](#)), ya descrito en el capítulo 3.

Los dos primeros estudios se realizaron utilizando ovejas como donantes de digesta ruminal. En el estudio #1, el pH del medio ruminal se modificó añadiendo heno o cebada al medio de cultivo, mientras que en el estudio #2 se emplearon diferentes soluciones amortiguadoras.

Los estudios #3 y #4 se realizaron empleando novillos como donantes de digesta ruminal. En ambos estudios se evaluó el nivel de concentrado en la dieta de los novillos empleados como donantes de líquido ruminal sobre el pH del inóculo y la digestibilidad de los alimentos. Además, en el estudio #3, se estudió el efecto de la adición de heno o cebada al medio de fermentación. En el estudio #4

se provocaron cambios en el pH en los cultivos mediante la utilización de diferentes disoluciones amortiguadoras del pH. Las disoluciones usadas en este último estudio se eligieron atendiendo a los resultados del estudio #2.

4.1.2.1 Inóculos

En el caso de las ovejas, el inóculo para las incubaciones se obtuvo a partir de digesta ruminal de cuatro hembras adultas provistas de cánula ruminal y alimentadas con heno de alfalfa (881 g materia seca (MS)/kg heno y 906 g materia orgánica (MO), 158 g proteína bruta (PB), 473 g fibra neutro detergente (FND), 307 g fibra ácido detergente (FAD) y 70 g lignina por kg de MS). La digesta ruminal para la obtención del inóculo se extrajo del rumen por la mañana, justo antes de la administración del alimento. Para obtener el líquido ruminal la digesta se filtró a través de cuatro capas de gasa y luego se añadió al medio de cultivo (mezcla de disoluciones de sales minerales, amortiguadoras de pH y reductora de O₂) en una proporción de 1:4 (v/v). La mezcla de inóculo (400 mL de líquido ruminal filtrado) con medio de cultivo (1600 mL) constituyó el medio de incubación o líquido ruminal diluido.

En el caso de los novillos, el inóculo se obtuvo a partir de digesta ruminal extraída de tres animales de raza parda provistos de cánula ruminal. Los novillos se alojaron en cubículos individuales, con agua a libre disposición y fueron alimentados de manera secuencial con piensos con diferentes proporciones de forraje y concentrado. Así, durante dos semanas los novillos recibieron una ración constituida exclusivamente por forraje. Al final de ese periodo se extrajo digesta para obtener el inóculo IF100. Posteriormente, los novillos consumieron una ración con un 50 % de forraje y un 50 % de concentrado (% en MS) durante otras dos semanas, al final de las cuales se extrajo digesta para obtener el inóculo IF50. Finalmente, los novillos fueron alimentados con una ración constituida por un 20 % de forraje y un 80 % de alimento concentrado (% en MS) durante otras dos semanas, al final de las cuales se extrajo digesta para obtener el inóculo IF20. El forraje fue un heno de hierba con la siguiente composición: 875 g MS/kg heno y 912 g MO, 106 g PB, 640 g FND, 322 g FAD y 47 g lignina por kg MS. Los ingredientes del alimento concentrado (pienso de arranque) fueron, principalmente, cebada (32 %), harina de soja (23,5 %) y maíz (16 %), además de pulpa de remolacha, melaza de remolacha, carbonato de calcio, manteca,

harinillas de trigo, ácidos grasos hidrogenados de palma, cloruro sódico, premezcla vitamínico mineral y fosfato bicálcico. La composición química de este pienso fue 936 g de MO, 170 g de PB, 45 g de grasa bruta, 55 g de fibra bruta y 113 g de FND por kg de pienso. Los tres animales recibieron la misma ración durante periodos consecutivos de 14 días, siguiendo la secuencia IF100, IF50, IF20. Con cada cambio de alimentación se esperaban cambios sustanciales en la microbiota ruminal, y se asumió que en cada periodo de 14 días había tiempo suficiente para la transición, el establecimiento y la adaptación de las comunidades microbianas a cada sistema de alimentación, hasta alcanzar cierta estabilidad ([Brown y col., 2006](#); [Fernando y col., 2010](#)).

La digesta para la obtención del inóculo se recogió el último día de cada periodo, cuatro horas después de la administración de la ración de la mañana, extrayendo de cada animal digesta del retículo, cerca al orificio reticulo-omasal. Mediante el filtrado de la digesta a través de varias capas de gasa se obtuvo 1 L de líquido ruminal de cada novillo, que luego se mezclaron para obtener un inóculo homogéneo de microorganismos ruminales.

4.1.2.2 Tratamientos y diseño experimental

En todos los estudios, el tratamiento control (CON) consistió en el uso del medio de cultivo descrito por [Menke y Steingass \(1988\)](#) solo, sin ninguna modificación ni adición de sustrato de fermentación diferente al de los alimentos sometidos a la evaluación de digestibilidad. Dicho medio consiste en una mezcla de sales minerales en una disolución amortiguadora de bicarbonato (4 g $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ y 35 g NaHCO_3 por litro de agua destilada). Esta disolución amortiguadora se añadió al medio de cultivo de forma que en la mezcla final de líquido ruminal diluido su concentración fue de 190 mL/L. La composición completa del medio de cultivo ha sido descrita en detalle en el capítulo anterior (apartado 3.1.1.3).

4.1.2.2.1 Estudio #1. Efecto de la adición de heno de gramínea o harina de cebada sobre la digestibilidad de varios forrajes

Teniendo como base el medio de cultivo del tratamiento control (CON) anteriormente descrito, en este estudio las variaciones en el pH se provocaron añadiendo al medio de cultivo dos sustratos fermentables: un forraje y un

concentrado. Es decir que, para alterar las condiciones de fermentación y la actividad de la microbiota, se añadió directamente a la vasija de fermentación heno de gramíneas (HEN; 10 g/L de medio) o harina de cebada (CEB; 10 g/L de medio). La composición química de estos alimentos fue la siguiente:

- a) heno de hierba: 875 g MS/kg heno y 912 g MO, 106 g PB, 640 g FND, 322 g FAD y 47 g lignina por kg MS
- b) harina de cebada: 905 g MS/kg cebada y 974 g MO, 109 g PB, 179 g FND y 48 g FAD por kg MS.

Ambos sustratos (heno y cebada) se molieron previamente (criba de 1 mm). La incubación se repitió en dos semanas distintas.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, y el modelo estadístico fue el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + s_j + t_i + \varepsilon_{ijk},$$

donde y_{ijk} representa el valor para cada observación individual, μ es la media, t_i es el efecto del tratamiento, s_j es el efecto de la semana (o tanda) de incubación y ε_{ijk} es la varianza o error residual. Los tratamientos corresponden a las condiciones de fermentación (i = control, heno o cebada para t_i). Los datos de digestibilidad de la materia seca de cada alimento incubado se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) con la tanda de incubación como factor de bloque y el tratamiento experimental como principal factor de variación. La comparación múltiple entre medias se realizó mediante el test de Bonferroni.

4.1.2.2.2 Estudio #2. Efecto de la solución amortiguadora sobre la digestibilidad de varios forrajes

Se emplearon cinco tratamientos experimentales, que consistieron en el empleo de cinco disoluciones amortiguadoras: el control (CON) y cuatro disoluciones de McIlvaine ([McIlvaine \(1921\)](#)) con distintas proporciones de Na_2HPO_4 y ácido cítrico. La vasija control llevaba líquido ruminal diluido con la disolución amortiguadora de bicarbonato. En las otras vasijas, al preparar el medio de cultivo se sustituyó dicha disolución amortiguadora por el mismo volumen de una de las siguientes disoluciones de McIlvaine ([McIlvaine \(1921\)](#)) (MI): MI180, MI360, MI420 y MI480, que contenían 180, 360, 420 y 480 ml/L de

ácido cítrico y 820, 640, 580 y 520 ml/L de Na₂HPO₄, respectivamente. La incubación se repitió en dos semanas distintas.

En este estudio se utilizó un diseño experimental completamente al azar, y el modelo estadístico fue el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + s_j + t_i + \varepsilon_{ijk},$$

donde y_{ijk} representa el valor para cada observación individual, μ es la media, t_i es el efecto del tratamiento, s_j es el efecto de la semana (o tanda) de incubación y ε_{ijk} es la varianza o error residual. Los tratamientos corresponden a las condiciones de fermentación (i = control, MI180, MI360, MI420 y MI480 para t_i). Los datos se analizaron mediante ANOVA con la tanda de incubación como factor de bloque y el tratamiento experimental como principal factor de variación. La comparación múltiple entre medias se realizó mediante el test de Bonferroni.

4.1.2.2.3 Estudio #3. Efecto del inóculo y de la adición de heno de gramínea o harina de cebada sobre la digestibilidad de varios forrajes

En este estudio se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 3 x 3: tres inóculos (IF100, IF50 ó IF20) y tres condiciones de fermentación (control, heno o cebada) durante las incubaciones *in vitro*. El control (CON), tal y como ya se ha descrito, consistió en utilizar el medio de cultivo descrito por [Menke y Steingass \(1988\)](#). En los otros dos tratamientos se alteraron las condiciones de fermentación y la actividad de la microbiota añadiendo directamente a la vasija de fermentación heno (HEN; 10 g/L de medio) o cebada (CEB; 10 g/L de medio). Ambos sustratos (henos y cebada) se molieron previamente (criba de 1 mm).

Los datos de digestibilidad de la materia seca de cada alimento incubado se analizaron mediante ANOVA de acuerdo con el modelo siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{(ij)} + \varepsilon_{ijk},$$

donde y_{ijk} representa el valor para cada observación individual, μ es la media, α_i es el efecto del factor inóculo, β_j es el efecto de las condiciones de fermentación, $\alpha\beta_{(ij)}$ es la interacción entre ambos factores y ε_{ijk} es la varianza o error residual. Los niveles de los factores estudiados fueron tres inóculos (i =

IF100, IF50 ó IF20 para α_i) y tres condiciones de fermentación (j = control, heno o cebada para β_j).

4.1.2.2.4 Estudio #4. Efecto del inóculo y de la solución amortiguadora sobre la digestibilidad de varios forrajes

En este estudio se usó un diseño completamente al azar con arreglo a un modelo factorial 3 x 3: tres inóculos (IF100, IF50 ó IF20) y tres disoluciones amortiguadoras del pH en el medio de cultivo: control (CON), MI180 y MI530. El control (CON) fue el mismo que ya se describió en los estudios anteriores. En los dos tratamientos restantes se reemplazaron los 190 mL de la disolución amortiguadora con bicarbonato/L de líquido ruminal diluido, por un volumen igual de una de las dos disoluciones McIlvane testadas ([McIlvaine \(1921\)](#)): disolución MI180, preparada con 180 mL de ácido cítrico (0,1 M) y 820 mL de Na_2HPO_4 (0,2 M) (pH=7), o disolución MI530, compuesta por 530 mL de ácido cítrico (0,1 M) y 470 mL de Na_2HPO_4 (0,2 M) (pH=4.6).

Los datos de digestibilidad de la materia seca de cada alimento incubado se analizaron mediante ANOVA de acuerdo con el modelo siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{(ij)} + \varepsilon_{ijk},$$

donde y_{ijk} representa el valor para cada observación individual, μ es la media, α_i es el efecto del factor inóculo, β_j es el efecto de las condiciones de fermentación, $\alpha\beta_{(ij)}$ es la interacción entre ambos factores y ε_{ijk} es la varianza o error residual. Los niveles de los factores estudiados fueron tres inóculos (i = IF100, IF50 ó IF20 para α_i) y tres condiciones de fermentación (j = control, MI180 o MI530 para β_j).

4.1.2.3 Incubación y determinación de la digestibilidad in vitro

La preparación del medio de cultivo y la adición de líquido ruminal filtrado (inóculo) se realizaron en condiciones de anaerobiosis. En los cuatro estudios, se determinó la digestibilidad *in vitro* de la materia seca de cuatro alimentos comúnmente utilizados en las raciones de rumiantes con diferente contenido, composición y características de la pared celular:

- a) heno de alfalfa (906 g MO, 158 g PB, 473 g FND, 307 g FAD y 70 g lignina por kg MS),

- b) heno de hierba (912 g MO, 106 g PB, 640 g FND, 322 g FAD y 47 g lignina por kg MS),
- c) paja de cebada (916 g MO, 28 g PB, 759 g FND, 472 g FAD y 48 g lignina por kg MS) y
- d) fibra de pulpa de remolacha (926 g MO, 58 g PB, 715 g FND, 240 g FAD y 23 g lignina por kg MS).

Los alimentos se molieron usando una criba de 1 mm y se secaron a 60 °C durante 48 h. Luego se pesaron 250 mg de cada alimento en las bolsas de fibra sintética porosa (F57; 45 x 55 mm, ANKOM Technology Corporation), las cuales se termosellaron y se introdujeron en las vasijas de fermentación. En cada vasija se introdujeron 22 bolsitas, cinco con cada uno de los cuatro alimentos estudiados y dos bolsas vacías que se utilizaron como blanco.

En cada incubación se usó una vasija de fermentación DAISY de 4 L de capacidad para cada tratamiento experimental.

Los estudios #1 y #2 se realizaron conjuntamente. Así, se usaron un total de 7 vasijas, una con el medio de cultivo control (CON), y una para cada uno de los tratamientos heno (HEN), cebada (CEB), MI180, MI360, MI420 y MI480. Las incubaciones se repitieron en dos semanas distintas (dos tandas de incubación).

Para los estudios #3 y #4 se realizaron secuencialmente tres tandas de incubación, con un intervalo quincenal entre tandas, en las que se emplearon los inóculos IF100 (primera tanda), IF50 (segunda tanda) y IF20 (tercera tanda). En cada una de las tandas de incubación se usaron un total de 5 vasijas: una con el medio de cultivo control (CON), y una para cada uno de los tratamientos heno (HEN), cebada (CEB), MI180 y MI530.

En todos los casos, dentro de cada fermentador Daisy, una vez colocadas las bolsitas con los alimentos, se dosificaron 1600 mL de medio de cultivo y 400 mL de inóculo ruminal, que se mezclaron e incubaron bajo condiciones de anaerobiosis. En el caso de los tratamientos HEN y CEB, que incluyeron heno o cebada (10 g/L de medio), la adición de estos sustratos a las vasijas se realizó una vez preparados los fermentadores para iniciar la incubación. Las incubaciones se prolongaron durante 24 h a 39 °C.

Después de la incubación, las muestras, en el interior de las bolsitas se sometieron a una extracción con detergente neutro a 100 °C durante 1 h utilizando el analizador de fibra de ANKOM. Se realizaron varios aclarados con agua destilada y uno final con acetona, y las bolsitas se secaron en estufa a 65 °C durante 48 h y se pesaron para determinar el residuo de incubación para calcular la digestibilidad *in vitro*.

El pH del contenido de cada vasija se midió en el momento de la inoculación (inicial) y tras 24 h de incubación (final).

4.1.3 RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra el efecto de la adición de cebada o de heno al medio de cultivo sobre el pH del medio y la digestibilidad *in vitro* de los forrajes (estudio #1).

Tabla 1. Efecto de la adición de cebada o de heno al medio de cultivo sobre el pH y la digestibilidad *in vitro* de varios forrajes (estudio #1).

	pH		Digestibilidad <i>in vitro</i>			
	Inicial	Final	Heno de alfalfa	Heno de hierba	Paja de cebada	Fibra de pulpa de remolacha
Control	6,97	7,00	0,496	0,446 a	0,378 a	0,709 a
Heno	7,00	6,70	0,495	0,436 a	0,371 a	0,706 a
Cebada	7,00	6,60	0,485	0,408 b	0,329 b	0,637 b
EED	--	--	0,0120	0,0107	0,0113	0,0180
<i>P</i> =	--	--	0,491	0,002	<0,001	<0,001

^{ab} Medias con superíndices distintos en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

EED = Error estándar de la diferencia. *P* = nivel de significación estadística.

La fermentación tanto de la cebada como del heno provocó un descenso del pH final en el medio de cultivo. A pesar de este descenso en el pH final del medio, no hubo diferencias entre tratamientos en la digestibilidad *in vitro* del heno de alfalfa. Por otra parte, al añadir cebada al medio de cultivo se observó una disminución significativa en la digestibilidad *in vitro* de los otros tres sustratos con respecto al control; pero esta disminución no se observó cuando se añadió el sustrato fibroso (heno) al medio de cultivo.

En la Tabla 2 se muestra el efecto de la adición de distintas disoluciones amortiguadoras de McIlvaine al medio de cultivo sobre el pH del medio y la digestibilidad *in vitro* de los forrajes (estudio #2).

Tabla 2. Efecto de la adición de distintas disoluciones amortiguadoras de McIlvaine al medio de cultivo sobre el pH y la digestibilidad *in vitro* de varios forrajes (estudio #2)

	pH		Digestibilidad <i>in vitro</i>			
	Inicial	Final	Heno de alfalfa	Heno de hierba	Paja de cebada	Fibra de pulpa de remolacha
Control	7,00	7,05	0,507 a	0,451 a	0,407 a	0,702 a
MI180	6,55	6,45	0,525 a	0,428 ab	0,286 b	0,545 b
MI360	6,30	6,40	0,520 a	0,402 b	0,284 b	0,468 c
MI420	5,90	6,00	0,451 b	0,314 c	0,152 c	0,407 d
MI480	5,80	5,90	0,450 b	0,320 c	0,142 c	0,406 d
EED	--	--	0,0180	0,0134	0,0190	0,0175
<i>P</i> =	--	--	0,013	<0,001	<0,001	<0,001

^{abcd} Medias con superíndices distintos en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

EED = Error estándar de la diferencia. *P* = nivel de significación estadística.

Las distintas combinaciones del buffer citrato:fosfato de McIlvaine (MI) dieron lugar a diferentes valores de pH, pero con todas las disoluciones el pH se mantuvo relativamente constante durante las 24 h de incubación. En todos los casos, la digestibilidad *in vitro* disminuyó ($P < 0,05$) con el pH, siendo este descenso más marcado en el caso de la paja de cebada y la fibra de pulpa de remolacha.

En la Tabla 3 se presentan los valores del pH del medio de cultivo con las distintas fuentes del inóculo y con la adición de substrato (heno o cebada) al medio (estudio #3).

Tabla 3. pH del medio de cultivo con las distintas fuentes del inóculo y con la adición de substrato (heno de gramínea o cebada) al medio (estudio #3)

Tratamientos	Momento de la incubación	Fuente del inóculo		
		IF100	IF50	IF20
Líquido Ruminant ¹		6,8	6,3	4,9
Control	Inicial ²	7,0	6,9	6,7
	Final ³	6,8	6,8	6,7
Heno de gramínea	Inicial ²	7,1	7,0	6,8
	Final ³	6,5	6,5	6,5
Cebada	Inicial ²	7,0	7,0	6,7
	Final ³	6,4	6,2	5,8

¹ pH del inóculo antes de mezclarlo con el medio de cultivo

² pH del medio de cultivo al iniciar la incubación

³ pH del medio de cultivo al terminar la incubación

La dieta de los animales donantes afectó al pH del líquido ruminal empleado como inóculo y alcanzó un valor marcadamente menor para el inóculo IF20 (4,9) que para los otros dos inóculos (6,8 y 6,3 para IF100 e IF50, respectivamente). No obstante, al mezclar el inóculo IF20 con la disolución amortiguadora el pH se corrigió, para alcanzar un rango de valores al inicio de la incubación comprendido entre 6,7 y 6,8, levemente inferior al rango de pH correspondiente a la mezcla del medio de cultivo y al inóculo IF100, que estuvo comprendido entre 7,0 y 7,1.

En el tratamiento control la variación del pH entre el inicio y el final de la incubación fue mínima; con la adición de heno, el pH final disminuyó hasta 6,5 con las tres fuentes de inóculo (IF100; IF50 e IF20), mientras que con la adición de cebada disminuyó aún más (6,4, 6,2 y 5,8, para IF100, IF50 e IF20, respectivamente). El pH final sólo fue inferior a 6,0 con la combinación del inóculo IF20 y la adición de cebada al medio de cultivo.

En la Tabla 4 se muestra el efecto de la fuente de inóculo y de la adición de grano de cebada y de heno de gramínea sobre la digestibilidad de la materia seca de los forrajes (estudio #3).

La fuente del inóculo afectó ($P < 0,001$) a la digestibilidad de todos los sustratos (heno de alfalfa, heno de gramínea, paja y fibra de pulpa de remolacha), que disminuyó al disminuir la proporción de forraje en la dieta de los animales donantes del inóculo. Sin embargo, la disminución entre el valor de digestibilidad obtenido con IF100 y el obtenido con IF20 fue diferente para los cuatro sustratos. Así, la mayor disminución se obtuvo para la paja, seguida por el heno de gramínea y la fibra de pulpa de remolacha y, por último, la menor disminución fue la obtenida con el heno de alfalfa.

El efecto de la adición de heno o cebada al medio de cultivo sobre la digestibilidad fue significativo ($P < 0,05$) para todos los sustratos, excepto para el heno de alfalfa. Comparando los valores con el control, la adición de la cebada ocasionó una mayor disminución de la digestibilidad que la adición de heno. También en este caso, la disminución entre el valor de digestibilidad obtenido al añadir cebada al medio fue diferente entre sustratos; así, se produjo una

disminución más acusada en el caso de la fibra de pulpa de remolacha que en el caso de la paja y el heno de gramíneas.

Tabla 4. Efecto de la adición de cebada o de heno al medio de cultivo sobre el pH y la digestibilidad *in vitro* de varios forrajes (estudio #3).

	Digestibilidad <i>in vitro</i>			
	Heno de alfalfa	Heno de hierba	Paja de cebada	Fibra de pulpa de remolacha
Control	0,470a	0,361a	0,272a	0,611a
Heno	0,486a	0,354a	0,259ab	0,603a
Cebada	0,478a	0,317b	0,235b	0,484b
IF100	0,492x	0,382x	0,321x	0,594x
IF50	0,478xy	0,366x	0,270y	0,603x
IF20	0,464y	0,285y	0,174z	0,501y
EED	0,0072	0,0076	0,0085	0,0118
<i>P</i> =				
Tratamiento (T)	0,305	<0,001	0,014	<0,001
Inóculo (I)	0,033	<0,001	<0,001	<0,001
T x I	0,650	0,384	0,126	0,299

^{ab} Medias con superíndices distintos en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($P < 0,05$).

^{xyz} Medias con superíndices distintos en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre inóculos ($P < 0,05$).

EED = Error estándar de la diferencia. *P* = nivel de significación estadística.

En la Tabla 5 se muestran los valores de pH del medio de cultivo con las distintas fuentes de inóculo y las diferentes soluciones amortiguadoras (estudio #4). Respecto al reemplazo de la solución amortiguadora, se observó que al aumentar la proporción de ácido cítrico en la solución McIlvaine disminuía el pH inicial del medio de cultivo. Así, en el caso de la solución MI180, el pH inicial con los inóculos IF100 e IF50 fue levemente inferior al control (7,0 y 6,9 contra 6,7 y 6,6, respectivamente), pero con el inóculo IF20 se redujo hasta 6,1. Por el contrario, con la solución MI530 se da una reducción importante del pH inicial, pues con los tres inóculos alcanza valores menores de 6,0 (5,8, 5,5 y 5,0 para IF100, IF50 e IF20, respectivamente). En cuanto al pH final, con el tratamiento MI180, osciló entre 6,2 (inóculo IF100) y 5,7 (IF20) mientras que con el tratamiento MI530 el valor de pH después de la incubación estuvo comprendido entre 5,7 (IF100) y 5,3 (IF50 y IF20).

Tabla 5. pH del medio de cultivo con las distintas fuentes de inóculo y las diferentes disoluciones amortiguadoras (estudio #4)

Tratamientos	Momento de la incubación	Fuente del inóculo		
		IF100	IF50	IF20
Control	Inicial ¹	7,0	6,9	6,7
	Final ²	6,8	6,8	6,7
MI180	Inicial ¹	6,7	6,6	6,1
	Final ²	6,2	6,0	5,7
MI530	Inicial ¹	5,8	5,5	5,0
	Final ²	5,7	5,3	5,3

¹ pH del medio de cultivo al iniciar la incubación

² pH del medio de cultivo al terminar la incubación

La Tabla 6 muestra el efecto de la fuente de inóculo y de la solución amortiguadora sobre la digestibilidad de los sustratos (estudio #4).

Tabla 6. Efecto de la fuente de inóculo y de la solución amortiguadora sobre la digestibilidad de la materia seca

	Digestibilidad <i>in vitro</i>			
	Heno de alfalfa	Heno de hierba	Paja de cebada	Fibra de pulpa de remolacha
Control	0,470a	0,361a	0,272a	0,611a
MI180	0,431b	0,310b	0,194b	0,443b
MI530	0,408c	0,253c	0,136c	0,282c
IF100	0,441x	0,337x	0,237x	0,476x
IF50	0,433x	0,311y	0,209y	0,469x
IF20	0,435x	0,276z	0,156z	0,392y
EED	0,0055	0,0066	0,0065	0,0109
<i>P</i> =				
Tratamiento (T)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Inóculo (I)	0,555	<0,001	<0,001	<0,001
T x I	0,002	<0,001	<0,001	0,063

^{ab} Medias con superíndices distintos en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($P < 0,05$).

^{xyz} Medias con superíndices distintos en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre inóculos ($P < 0,05$).

EED = Error estándar de la diferencia. *P* = nivel de significación estadística.

La fuente de inóculo no afectó ($P > 0,05$) a la digestibilidad del heno de alfalfa, pero sí a la digestibilidad del resto de los sustratos, que disminuyó al disminuir la proporción de forraje en la dieta de los animales donantes, aunque no resultó afectada en la misma medida en todos los sustratos; en orden de mayor

menor grado de reducción de la digestibilidad, encontramos los sustratos: paja y fibra de pulpa de remolacha > heno de gramínea.

Respecto a la modificación de la solución amortiguadora se observó que la disminución del pH, inducido por la adición de MI, dio lugar a una disminución de la digestibilidad de todos los sustratos (Tabla 6). Este efecto fue mayor con MI530 (pH menor) que con MI180, y fue más evidente a medida que la proporción de concentrado en la dieta de los animales donantes aumentaba.

4.1.4 DISCUSIÓN

En contraste con el método original de digestibilidad *in vitro* de los alimentos para rumiantes ([Tilley y Terry, 1963](#); [Goering y Van Soest, 1970](#)), en el que alimento se incubaba inicialmente en líquido ruminal diluido durante 48 h, en el presente estudio dicha incubación tuvo una duración de 24 h. Son numerosas las variaciones de la técnica de digestibilidad *in vitro* ([López, 2005](#)), y en la mayoría de ellas la primera incubación en un cultivo de microorganismos ruminales es de 48 h, aunque también se han utilizado incubaciones de 24 h. Teniendo en cuenta el objetivo de los estudios que se presentan en este capítulo, se estimó más apropiado que dicha incubación tuviese una duración de 24 h. En primer lugar, el objetivo no consistió en obtener una estimación exacta o aproximada de los coeficientes de digestibilidad de los diferentes alimentos utilizados (henos, paja o pulpa de remolacha), ni siquiera en hacer una comparación entre dichos sustratos en cuanto a su degradación en el rumen (todas las comparaciones se realizaron entre tratamientos experimentales para cada sustrato por separado). El objetivo fue examinar el efecto de variaciones en las condiciones de incubación (fundamentalmente en el pH en el medio de cultivo) sobre la degradación ruminal y la digestibilidad de cada sustrato. Cuando los alimentos se incuban *in vitro*, las mayores diferencias entre tratamientos se observan en las primeras 24 h de fermentación ([López, 2005](#)), ya que es en este periodo cuando se producen mayores cambios en las comunidades microbianas del inóculo ([Piao y col., 2014](#); [Lengowski y col., 2016](#); [Liu y col., 2016](#)). En esta fase las diferencias en la degradabilidad se deben, fundamentalmente, a las diferencias en el ritmo de fermentación ([López, 2005](#)). A partir de ese momento, se atenúan los ritmos de fermentación y las diferencias entre sustratos, aunque se mantienen, se hacen menos ostensibles, y a partir de las 48 h las diferencias se deben más a la

fracción indigestible de cada sustrato. Por este motivo, se decidió que para identificar de forma más clara los efectos de las variaciones del pH del medio de cultivo sobre la medida en que los sustratos eran degradados en el rumen era más oportuno realizar incubaciones a 24 h. Además, lo más importante era que el tiempo y todas las condiciones de incubación fuesen idénticas en todos los casos, excepto las variaciones impuestas en el pH del medio de cultivo, ya que este era el factor de variación a estudiar. Al acortarse el periodo de incubación, también podía reducirse la cantidad de sustrato incubado. En estos estudios se incubaron 250 mg de cada sustrato, en comparación con la técnica original en la que se usan 500 mg para poder obtener una cantidad de residuo de incubación que pueda ser pesada con suficiente precisión.

El tipo de dieta suministrada a los animales donantes tuvo un efecto marcado sobre el pH del inóculo, que fue notablemente menor con la ración IF20. Este bajo pH obtenido con la dieta con mayor proporción de concentrado está en consonancia con las observaciones de [Krause y Oetzel \(2006\)](#), quienes señalaron que el pH ruminal está determinado por la cantidad de carbohidratos fermentables consumidos en cada comida. Sin embargo, la adición de la solución del bicarbonato amortiguó sensiblemente el pH en el medio de cultivo, con lo que al inicio de la incubación los valores de pH fueron cercanos a 7,0, mostrando así la fuerte capacidad amortiguadora del bicarbonato ([Kohn y Dunlap, 1998](#)).

A pesar de que la mezcla de los inóculos con el medio de cultivo corrigió el pH, el aumento en la proporción de concentrado en la dieta de los animales donantes, excepto en el caso del heno de alfalfa, tuvo un claro efecto sobre la digestibilidad de los sustratos incubados, efecto similar al registrado por [Tejido y col. \(2002\)](#), quienes observaron una menor digestibilidad *in vitro* de la paja de avena y del heno de gramíneas cuando el inóculo procedía de animales alimentados con una dieta con un 80 % de concentrado que cuando procedía de animales alimentados con una dieta con solo un 20 % de concentrado. Estos resultados sugieren que, tal y como señalaban [Serment y col. \(2016\)](#), la digestibilidad, y la fermentación ruminal en su conjunto, resultan afectadas de manera determinante por la adaptación de las bacterias al sustrato sometido a evaluación.

Respecto al efecto de la adición de cebada o heno, la marcada disminución del pH final ocasionada principalmente por la adición de cebada guarda relación con su alto contenido de carbohidratos fermentables ([Jaurena y col., 2005](#)) y concuerda con los resultados presentados por [Mould y col. \(2005\)](#), quienes observaron, empleando el medio de cultivo descrito por [Theodorou y col. \(1994\)](#), un descenso en el pH del medio de cultivo de 6,7 a 6,0 después de 24 h de incubación como resultado de la adición de 1,0 g de trigo en 100 mL. En nuestro trabajo también se observó una disminución del pH, aunque de menor magnitud, con la adición heno. Tanto añadiendo cebada como heno al medio de cultivo, la ratio substrato fermentado : solución amortiguadora aumenta respecto al control. [Cantalapiedra-Hijar y col. \(2011\)](#) estudiaron el efecto sobre el pH de dos niveles de materia seca (23,5 g/L y 35 g/L) en fermentadores continuos y apreciaron una disminución del pH entre ambos niveles, observando una disminución desde un rango de pH de 6,2-6,5 hasta un rango 5,7-6,1, utilizando como substratos de fermentación heno de gramíneas o heno de alfalfa solos o mezclados con concentrados.

Por otra parte, en contraste con la adición de heno y cebada, se observó una marcada disminución del pH inicial cuando se usaron las soluciones amortiguadoras MI180 y MI530, incluso en el caso del inóculo IF100, lo cual está en consonancia con el pH esperado según lo planteado por [McIlvaine \(1921\)](#) para esas dos proporciones de mezcla entre ácido cítrico y ácido fosfórico. Adicionalmente, y más allá del efecto inicial, el pH final del tratamiento MI180 disminuyó paulatinamente con los inóculos IF100, IF50 e IF20 mientras que con el tratamiento MI530 disminuyó abruptamente desde 5,7 con el inóculo IF100 hasta 5,3 con los inóculos IF50 e IF20. Dado que esta solución amortiguadora no contiene bicarbonato, la capacidad amortiguadora del pH no es tan efectiva para neutralizar el efecto de la acumulación de productos (ácidos) de la fermentación, lo que da lugar a una reducción del pH no compatible con la fermentación ruminal ([Grant y Mertens, 1992b](#)). La disolución de bicarbonato del control tiene una elevada capacidad amortiguadora, por lo que no es posible provocar cambios en el pH, e investigar sus efectos sobre la digestibilidad. En consecuencia, se propuso como método alternativo para disminuir el pH del medio de cultivo añadir

ácido cítrico o ácido fosfórico en sustitución de la solución amortiguadora con bicarbonato ([Grant y Mertens, 1992a](#)).

La disminución de la digestibilidad que se observó con el pH bajo obtenido con la adición de las soluciones McIlvaine, que fue mayor cuanto más disminuyó el pH, se corresponde con los resultados de [Mourino y col. \(2001\)](#), quienes observaron una disminución de la tasa de digestión de la celulosa a medida que el pH inicial descendía desde 6,9 a 6,0, aunque los valores de pH se mantenían a lo largo de la fermentación. Por otra parte, [Russell y Wilson \(1996\)](#) observaron que incluso una disminución moderada en el pH puede tener un impacto negativo sobre la digestión ruminal *in vitro* de celulosa, y observaron que la fermentación de heno se inhibía drásticamente cuando el pH final estaba por debajo de 5,70. También se ha demostrado que, con la disminución del pH hasta 5,8, la digestibilidad de los sustratos con alto contenido de carbohidratos estructurales (heno) se ve más afectada que la de sustratos ricos en carbohidratos rápidamente fermentables (grano de maíz) ([Russell, 1998](#)). El efecto del pH en el medio de incubación sobre la digestibilidad de los forrajes podría atribuirse a la sensibilidad de las bacterias fibrolíticas, sobre todo de las celulolíticas ([Voelker y Allen, 2003](#)), a la disminución del pH en el rumen, lo que reduce su actividad para hidrolizar los polisacáridos estructurales del alimento.

En el tratamiento control la mayor digestibilidad correspondió a la fibra de pulpa de remolacha, seguida por el heno de alfalfa, el heno de gramínea y la paja, lo que puede estar relacionado con la composición de la fibra de cada uno de estos sustratos. Así, se han obtenido valores de digestibilidad para la FND de la pulpa de remolacha superiores al 89 % en 24 h ([Fadel y col., 2000](#)), lo que se explica por su alto contenido de fibra soluble ([Voelker y Allen, 2003](#)). Por el contrario, la digestibilidad de la paja es baja, como corresponde a los subproductos agrícola fibrosos ([Kernan y col., 1979](#)). La reducción en la digestibilidad debida a la disminución del pH del inóculo fue más acusada en la fibra de pulpa de remolacha y en la paja que en los henos, hecho que debe atribuirse a las diferencias entre sustratos en la composición de la fibra, en especial en su contenido en celulosa o en fibra soluble (contenido y composición de la hemicelulosa) y en el grado de lignificación de la pared celular.

4.1.5 CONCLUSIONES

Al disminuir el pH del rumen mediante cambios en la composición del medio de cultivo, la adición de sustratos con mayor contenido en hidratos de carbono rápidamente fermentables o la inoculación de los cultivos con líquido ruminal de animales alimentados con piensos ricos en concentrados, disminuye la digestibilidad de los forrajes. La digestibilidad se reduce en mayor medida para los forrajes con mayor contenido en fibra.

4.1.6 BIBLIOGRAFIA

- Adesogan, A. T. (2005). Effect of bag type on the apparent digestibility of feeds in ANKOM DAISY[®] incubators. *Animal Feed Science and Technology*, 119, 333-344.
- Brown, M. S., Ponce, C. H., and Pulikanti, R. (2006). Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: Performance and ruminal metabolism. *Journal of Animal Science*, 84 Suppl, E25-33.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Yanez-Ruiz, D. R., Newbold, C. J., and Molina-Alcaide, E. (2011). The effect of the feed-to-buffer ratio on bacterial diversity and ruminal fermentation in single-flow continuous-culture fermenters. *Journal of Dairy Science*, 94, 1374-1384.
- Elving, P. J., Markowitz, J. M., and Rosenthal, I. (1956). Preparation of buffer systems of constant ionic strength. *Analytical Chemistry (Washington)*, 28, 1179-1180.
- Fadel, J., DePeters, E., and Arosemena, A. (2000). Composition and digestibility of beet pulp with and without molasses and dried using three methods. *Animal Feed Science and Technology*, 85, 121-129.
- Fernando, S. C., Purvis, H., Najar, F., Sukharnikov, L., Krehbiel, C., Nagaraja, T., Roe, B., and DeSilva, U. (2010). Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 7482-7490.
- Goering, H. K., and Van Soest, P. J. (1970). Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications) *Agriculture Handbook No. 379*. Washington: ARS-USDA.
- Grant, R. J., and Mertens, D. R. (1992a). Development of buffer systems for pH control and evaluation of pH effects on fiber digestion *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 75, 1581-1587.
- Grant, R. J., and Mertens, D. R. (1992b). Influence of buffer pH and raw corn starch addition on *in vitro* fiber digestion kinetics. *Journal of Dairy Science*, 75, 2762-2768.
- Jaurena, G., Moorby, J. M., and Davies, D. R. (2005). Efficiency of microbial protein synthesis on red clover and ryegrass silages supplemented with barley by rumen simulation technique (RUSITEC). *Animal Feed Science and Technology*, 118, 79-91.
- Kaufmann, W. (1976). Influence of the composition of the ration and the feeding frequency on pH-regulation in the rumen and on feed intake in ruminants. *Livestock Production Science*, 3, 103-114.
- Kernan, J. A., Coxworth, E. C., Crowle, W. I., and Spurr, D. T. (1979). Straw quality of cereal cultivars before and after treatment with anhydrous ammonia. *Canadian Journal of Animal Science*, 59, 511-517.
- Kohn, R. A., and Dunlap, T. F. (1998). Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and *in vitro*. *Journal of Animal Science*, 76, 1702-1709.
- Krause, K. M., and Oetzel, G. R. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 126, 215-236.
- Lana, R. P., Russell, J. B., and Van Amburgh, M. E. (1998). The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *Journal of Animal Science*, 76, 2190-2196.

- Lengowski, M. B., Zuber, K. H. R., Witzig, M., Möhring, J., Boguhn, J., and Rodehutschord, M. (2016). Changes in rumen microbial community composition during adaption to an *in vitro* system and the impact of different forages. *PLoS ONE*, 11(2), e0150115. Retrieve from Doi:10.1371/journal.pone.0150115
- Liu, J., Zhang, M., Xue, C., Zhu, W., and Mao, S. (2016). Characterization and comparison of the temporal dynamics of ruminal bacterial microbiota colonizing rice straw and alfalfa hay within ruminants. *Journal of Dairy Science*, 99, 9668-9681.
- López, S. (2005). *In vitro* and *in situ* techniques for estimating digestibility. In J. M. Forbes y J. France (Eds.), *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*, 2nd edn. CAB International, (pp. 87-121). Wallingford, UK.
- McIlvaine, T. C. (1921). A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry*, 49, 183-186.
- Menke, K. H., and Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28, 7-55.
- Miller, B. G., and Muntifering, R. B. (1985). Effect of forage - concentrate on kinetics of forage fiber digestion *in vivo*. *Journal of Dairy Science*, 68, 40-44.
- Mould, F. L., Kliem, K. E., Morgan, R., and Mauricio, R. M. (2005). *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 31-50.
- Mourino, F., Akkarawongsa, R., and Weimer, P. J. (2001). Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 84, 848-859.
- Ottou, J. F., and Doreau, M. (1996). Influence of niacin on *in vitro* ruminal fermentation and microbial synthesis depending on dietary factors. *Animal Feed Science and Technology*, 58, 187-199.
- Piao, H., Lachman, M., Malfatti, S., Sczyrba, A., Knierim, B., Auer, M., Tringe, S. G., Mackie, R. I., Yeoman, C. J., and Hess, M. (2014). Temporal dynamics of fibrolytic and methanogenic rumen microorganisms during *in situ* incubation of switchgrass determined by 16S rRNA gene profiling. *Frontiers in microbiology*, 5, 307. Retrieve from Doi:10.3389/fmicb.2014.00307
- Russell, J. B. (1998). The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 81, 3222-3230.
- Russell, J. B., and Wilson, D. B. (1996). Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *Journal of Dairy Science*, 79, 1503-1509.
- Serment, A., Giger-Reverdin, S., Schmidely, P., Dhumez, O., Broudiscou, L. P., and Sauvant, D. (2016). *In vitro* fermentation of total mixed diets differing in concentrate proportion: Relative effects of inocula and substrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 160-168.
- Tejido, M. L., Ranilla, M. J., and Carro, M. D. (2002). *In vitro* digestibility of forages as influenced by source of inoculum (sheep rumen versus RUSITEC fermenters) and diet of the donor sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 97, 41-51.

- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., and France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48, 185-197.
- Tilley, J., and Terry, R. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass and Forage Science*, 18, 104-111.
- Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. Ithaca and London: Cornell University Press.
- Voelker, J., and Allen, M. (2003). Pelleted beet pulp substituted for high-moisture corn: 2. Effects on digestion and ruminal digestion kinetics in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86, 3553-3561.
- Wilman, D., and Adesogan, A. (2000). A comparison of filter bag methods with conventional tube methods of determining the *in vitro* digestibility of forages. *Animal Feed Science and Technology*, 84, 33-47.

4.2 EFECTO DE LA RELACIÓN FORRAJE/CONCENTRADO EN LA RACIÓN Y DEL PH DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL PATRÓN DE FERMENTACIÓN, LA PRODUCCIÓN DE METANO Y LA BIOHIDROGENACIÓN RUMINAL

4.2.1 INTRODUCCIÓN

Desde hace décadas se ha producido la intensificación de la producción agropecuaria y un aumento de la capacidad productiva de los rumiantes que implicaron la necesidad de incluir en las raciones de estos animales alimentos de alta densidad energética. Por ello, los piensos de los rumiantes contienen cada vez menos fibra y más carbohidratos de fermentación rápida ([Tremere y col., 1968](#)). Este tipo de alimentos ha ocasionado una creciente alteración de la fermentación ruminal ([González y col., 2012](#)) y del proceso de biohidrogenación ruminal que compromete la producción ruminal de ciertos ácidos grasos insaturados (C18:1 *n*-7 y C18:2 *n*-7) ([Bauman y Griinari, 2001](#)). Debido al interés de estos metabolitos funcionales para la salud humana ([Dilzer y Park, 2012](#)) se ha intentado aumentar su formación en el rumen mediante la suplementación lipídica de los piensos ([Wang y Song, 2003](#); [Szczechowiak y col., 2016](#)); pero se ha observado que una misma suplementación lipídica aplicada a dietas de diferente contenido en forraje puede provocar efectos muy diversos ([Gomez-Cortes y col., 2011](#); [Vahmani y col., 2013](#); [Toral y col., 2014](#)). Por otro lado, se ha planteado la importancia de distinguir entre el efecto naturaleza de la dieta, *per se*, y del pH del medio sobre el patrón de fermentación y la biohidrogenación ruminal ([Calsamiglia y col., 2008](#); [Martínez y col., 2011](#)). El empleo de sistemas *in vitro* para simular la fermentación ruminal bajo condiciones controladas, como el sistema RUSITEC, constituye una herramienta sobresaliente para estudiar los factores mencionados ([Czerkawski y Breckenridge, 1977](#)). En estos simuladores de la fermentación ruminal es posible utilizar una solución amortiguadora que permita variar el pH independientemente de la composición de la dieta estudiada. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de la relación forraje : concentrado en el pienso y del pH en el rumen sobre el patrón de fermentación y la composición de ácidos grasos en la digesta en fermentadores RUSITEC.

4.2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Tal y cómo se describió en el capítulo 3, el estudio se llevó a cabo utilizando 16 vasijas de fermentación (de 650 mL de volumen útil) diseñadas según el sistema de simulación ruminal RUSITEC ([Czerkawski y Breckenridge, 1977](#)). Se utilizó como inóculo la digesta ruminal de ovejas de raza merina, que recibían una ración compuesta por un heno de hierba (70 %) y un alimento concentrado (30 %).

En el primer día del experimento, se inició el periodo de adaptación tras la inoculación de cada vasija con 400 mL de líquido ruminal filtrado y diluido en 250 mL de saliva artificial y 80 g de un residuo de digesta ruminal obtenido tras haber extraído el líquido.

4.2.2.1 Tratamientos experimentales

El diseño del experimento se ajustó a un modelo factorial 2 x 2: dos piensos empleados como sustrato de fermentación con diferente relación forraje : concentrado (**pienso F** con un alto contenido en forrajes y **pienso C** con un alto contenido en alimentos concentrados), y dos niveles de pH en el medio de cultivo (**pH alto** y **pH bajo**).

Los ingredientes y la composición química de los piensos experimentales se recogen en la Tabla 7. Los piensos fueron preparados cada tres días y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Para obtener los dos pH diferentes en el medio de cultivo, se infundieron dos tipos de saliva artificial: la disolución de sales minerales preparada de acuerdo con la fórmula de ([McDougall, 1948](#)) con la que se pretendió mantener en el medio de cultivo lo que denominaremos un **pH alto** (pH= 6,8), y una saliva modificada con la que se pretendió reducir sensiblemente el pH, manteniendo un **pH bajo** (pH= 6,4). La composición de los dos tipos de saliva artificial infundidas para obtener el pH alto o el pH bajo en el medio de cultivo se muestra en la Tabla 8.

Tabla 7. Ingredientes y composición química de los piensos experimentales¹

	Pienso F	Pienso C
Ingredientes, % MS		
Maíz	6,2	21,2
Cebada	3,8	12,8
Torta de soja	5,0	17,0
Heno de gramíneas	72,8	14,6
Heno de alfalfa	5,0	17,0
Pulpa de remolacha	2,3	7,7
Melaza de remolacha	1,5	5,1
Corrector vitamínico mineral	0,5	1,7
Aceite de girasol ²	3,0	3,0
Composición química, g /kg MS		
Materia orgánica	919	912
Proteína bruta	127	186
Fibra neutro detergente	502	284
Fibra ácido detergente	273	154
Celulosa	257	144
Lignina	15,8	9,3
Extracto etéreo	45	56
Ácidos grasos (AG) en el pienso, % del total de AG²		
C14:0	0,5	0,3
C16:0	15,1	13,9
C16:1	2,1	1,7
C18:0	7,6	6,2
C18:1 c9	29,0	29,9
C18:2 c9c12	34,2	40,4
C18:3 c9c12c15	4,9	3,3

¹ Pienso experimentales:

Pienso F = proporción alta de forrajes (henos de gramíneas y de alfalfa)

Pienso C = proporción alta de alimentos concentrados (maíz, cebada y soja)

² Aceite de girasol: 8,5 % C16:0, 4,9 % C18:0, 35,4 % C18:1 c9, 47,8 % C18:2 c9c12 y 0,3 % C18:3 c9c12c15.

Tabla 8. Composición de los dos tipos de saliva artificial infundidas para obtener el **pH alto** o el **pH bajo** en el medio de cultivo

	pH alto	pH bajo
Ingredientes, g/L		
NaHCO ₃	9,8	6,5
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	9,3	5,0
NaCl	0,47	3,4
KCl	0,57	0,45
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,053	0,070
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,13	0,10

4.2.2.2 Recogida y análisis de las muestras

Tras el periodo de adaptación se procedió al registro de mediciones y la recogida de muestras (producción total de gas y de metano, volumen de líquido efluente y concentración en el mismo de ácidos grasos volátiles (AGV), L-lactato y amoniaco) durante un periodo de 14 días. También se determinó la desaparición de sustrato tras 48 h de incubación y la síntesis de proteína microbiana (utilizando ¹⁵N como marcador). El último día del experimento, se recogieron y prepararon muestras para el análisis de ácidos grasos de cadena larga, que fueron congeladas a -80 °C y liofilizadas. Los ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía de gases tras la extracción de la grasa y la metilación de los ácidos grasos. Los procedimientos para el registro de datos, la recogida de muestras y los análisis de laboratorio han sido descritos en detalle en el capítulo 3.

4.2.2.3 Análisis de la composición química

Los piensos experimentales y los residuos de incubación se analizaron para determinar su contenido en materia seca (método AOAC 934.01), cenizas (método AOAC 942.05) y N (método AOAC 984.13) de acuerdo con la [AOAC \(1999\)](#). Las determinaciones de FND (método AOAC 2002.04), FAD y lignina (métodos AOAC 973.18) se llevaron a cabo de acuerdo con el método de [Van Soest y col. \(1991\)](#), utilizando un analizador de fibra ANKOM220 (ANKOM Technology Corporation, NY, EE.UU.). El extracto etéreo fue determinado por tecnología de filtro de mangas ([AOCS, 2008; Procedimiento Am 5-04](#)).

4.2.2.4 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el procedimiento GLM de [SAS \(2002\)](#) para un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2: dos piensos (**pienso F** o **pienso C**) y dos niveles de pH en el medio de fermentación (**pH alto** o **pH bajo**), con cuatro réplicas por tratamiento ([Steel y Torrie, 1981](#)). Los cuatro tratamientos experimentales se asignaron al azar a las vasijas de fermentación (16), de forma que para cada tratamiento se dispuso de cuatro vasijas. Cada vasija fue considerada una unidad experimental independiente, dando como resultado las cuatro réplicas por tratamiento.

Los datos se analizaron mediante ANOVA de acuerdo con el siguiente modelo estadístico:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{(ij)} + \varepsilon_{ijk},$$

donde y_{ijk} representa el valor para cada observación individual, μ es la media, α_i es el efecto del tipo de pienso, β_j es el efecto del pH ruminal, $\alpha\beta_{(ij)}$ es la interacción entre ambos factores y ε_{ijk} es el término error residual que corresponde al efecto aleatorio de la variabilidad entre réplicas dentro de cada tratamiento. Se consideró que un efecto fue estadísticamente significativo si $P < 0,05$ y que había una tendencia cuando $P < 0,10$. Los niveles de los factores estudiados fueron dos piensos ($i = \text{pienso F}$ o **pienso C** para α_i) y dos niveles de pH en el medio de fermentación ($j = \text{pH alto}$ o **pH bajo** para β_j). Para la comparación múltiple de medias (entre los cuatro valores de la interacción $\alpha\beta_{(ij)}$) se usó la prueba de Tukey.

4.2.3 RESULTADOS

4.2.3.1 Fermentación ruminal

El efecto del tipo de pienso (Pienso F o Pienso C) y del pH del medio sobre la fermentación ruminal se recoge en la Tabla 9. La interacción entre los factores considerados no fue significativa ($P > 0,05$) en ningún caso.

4.2.3.1.1 Efecto del tipo de pienso

El tipo de pienso no afectó ($P > 0,05$) al volumen de efluente. El pH ruminal fue menor con el Pienso C ($P = 0,031$), siendo este descenso más acusado cuando los piensos se incubaron a un pH más bajo. El tipo de pienso tuvo un efecto significativo ($P < 0,05$) sobre los coeficientes de desaparición de la MO, la FND, la FAD y la celulosa, que alcanzaron valores mayores con el pienso C que con el pienso F. No hubo diferencias significativas entre ambos piensos en los coeficientes de desaparición de la PB y el EE ($P > 0,05$). La producción total de gas de fermentación fue mayor ($P < 0,05$) al incubar el pienso C, pero el tipo de pienso no afectó de forma significativa ($P > 0,05$) ni a la proporción de metano en el gas de fermentación, ni a la producción diaria de metano, ni a la producción de metano expresada por g de materia orgánica fermentable.

La producción total de AGV fue mayor ($P < 0,05$) con el pienso C que con el pienso F y también se observaron algunas diferencias significativas en el patrón de fermentación. Así, tanto la producción de butirato como de valerato, caproato e isoácidos fueron mayores ($P < 0,001$) para el pienso C que para el pienso F. La ratio acetato : propionato también fue mayor ($P < 0,001$) con el pienso C que con el pienso F, aunque no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre piensos en las producciones de acetato y propionato. Por último, la producción de L-lactato fue mayor ($P < 0,01$) con el pienso C que con el pienso F.

En cuanto al metabolismo nitrogenado, tanto la producción diaria de amoníaco como síntesis diaria de proteína microbiana fueron mayores ($P < 0,05$) con el pienso C que con el pienso F. Sin embargo, la eficiencia de síntesis de proteína microbiana (g/100 g de MOF) no se vio afectada ($P > 0,05$) por el tipo de pienso.

4.2.3.1.2 Efecto del pH

El pH en el medio de cultivo tuvo un efecto significativo ($P < 0,05$) sobre los coeficientes de desaparición de la MO, la PB y del EE, que alcanzaron valores inferiores con el pH 6,4 que con el pH 6,8. El pH no afectó ($P > 0,05$) a los coeficientes de desaparición del resto de las fracciones (FND, FAD y celulosa).

La producción total de gas de fermentación fue menor ($P < 0,05$) con el pH más bajo, pero el pH no afectó ($P > 0,05$) ni a la proporción de metano en el gas producido, ni a la producción de metano.

La producción total de AGV tendió a ser menor ($P = 0,05$) con el pH 6,4 que con el pH 6,8 y se observaron algunas diferencias significativas en el patrón de fermentación. Así, tanto la producción de acetato como de isoácidos fueron menores a un pH 6,4 que a un pH 6,8. El pH no tuvo un efecto significativo sobre las producciones de propionato, butirato y L-lactato. La ratio acetato : propionato fue menor ($P < 0,05$) al disminuir el pH en el medio de cultivo, pero sólo cuando se incubó el pienso C.

En cuanto al metabolismo nitrogenado, la producción diaria de amoníaco fue menor ($P < 0,05$) con el pH 6,4 que con el pH 6,8. Sin embargo, la síntesis diaria de proteína y la eficiencia de síntesis de proteína microbiana (g/100 g de MOF) no se vieron afectadas por el pH en el medio de cultivo.

Tabla 9. Efecto del pienso y del pH (alto o bajo) en el medio de cultivo sobre la fermentación ruminal

	Pienso F ¹		Pienso C ¹		DER ²	P =		
	pH alto	pH bajo	pH alto	pH bajo		Pienso	pH	Pienso x pH
Volumen del efluente, mL/d	442	505	466	463	52,0	0,721	0,269	0,226
pH	6,83 ^a	6,52 ^b	6,81 ^a	6,37 ^c	0,069	0,031	<0,001	0,098
Coeficientes de desaparición, g/100 g incubados								
Materia orgánica (sin grasa)	50,1 ^b	48,2 ^b	68,4 ^a	63,8 ^a	2,72	<0,001	0,038	0,346
Fibra neutro detergente	26,6	24,7	31,1	28,8	3,49	0,030	0,246	0,928
Fibra ácido detergente	21,2	19,5	25,1	24,0	3,54	0,038	0,438	0,858
Celulosa	23,5 ^{ab}	21,5 ^b	29,7 ^a	28,3 ^{ab}	3,25	0,002	0,308	0,875
Proteína bruta	67,6 ^{ab}	63,0 ^b	71,5 ^a	64,6 ^b	2,99	0,091	0,003	0,440
Extracto etéreo	68,9 ^{ab}	64,0 ^b	73,2 ^a	62,7 ^b	4,15	0,481	0,004	0,206
Producción de gas								
Total, L/día	2,01 ^b	1,77 ^b	2,61 ^a	2,21 ^{ab}	0,235	0,002	0,025	0,533
CH ₄ , mL/100 mL gas	7,66	7,26	6,42	6,87	1,867	0,426	0,979	0,671
CH ₄ , mmol/día	6,80	5,18	7,84	6,81	2,096	0,251	0,254	0,791
CH ₄ , mmol/g de MOF ³	0,961	0,756	0,834	0,773	0,216	0,635	0,267	0,538
AGV, mmol/día								
Acetato	18,0 ^{ab}	16,3 ^b	19,2 ^a	16,4 ^b	1,30	0,377	0,005	0,416
Propionato	8,76	8,30	8,06	7,66	0,835	0,135	0,328	0,935
Butirato	6,25 ^b	6,01 ^b	8,17 ^a	8,19 ^a	0,381	<0,001	0,580	0,506
Valerato	3,44 ^b	3,24 ^b	4,39 ^a	4,50 ^a	0,281	<0,001	0,761	0,297
Caproato	1,63 ^b	1,67 ^b	3,86 ^a	3,36 ^a	0,468	<0,001	0,347	0,265
Iso-ácidos	0,88 ^{bc}	0,72 ^c	1,37 ^a	1,09 ^b	0,112	<0,001	0,002	0,282
Total	39,4 ^{ab}	36,9 ^b	45,6 ^a	41,2 ^{ab}	3,12	0,007	0,050	0,576
Ratio acetato:propionato	2,04 ^{bc}	2,00 ^c	2,46 ^a	2,24 ^b	0,097	<0,001	0,024	0,086
L-lactato, mg/d	6,4 ^c	7,8 ^{bc}	13,0 ^a	12,7 ^{ab}	1,96	0,001	0,622	0,489
Metabolismo nitrogenado								
Amoníaco, mg/d	84,8 ^c	76,4 ^c	143,3 ^a	124,0 ^b	8,19	<0,001	0,006	0,205
Proteína microbiana								
g/d	0,448 ^b	0,480 ^{ab}	0,603 ^a	0,539 ^{ab}	0,0706	0,016	0,676	0,221
g/100 g MOF ³	6,40	7,17	6,57	6,24	0,962	0,467	0,675	0,299

¹ **Pienso F** = proporción alta de forrajes (henos de gramíneas y de alfalfa) y **Pienso C** = proporción alta de alimentos concentrados (maíz, cebada y soja)

² DER = desviación estándar residual

³ MOF = materia orgánica fermentable

^{a, b, c} Dentro de una misma línea, las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos ($P < 0,05$, prueba de Tukey)

Tabla 10. Efecto del pienso y del pH (alto o bajo) en el medio de cultivo sobre el perfil y la hidrogenación de los ácidos grasos (AG) en la digesta ruminal

	Pienso F ¹		Pienso C ¹		DER ²	P =		
	pH alto	pH bajo	pH alto	pH bajo		Pienso	pH	Pienso x pH
Ácidos grasos de la digesta (% del total AG)								
C14:0	1,90	2,63	1,89	1,39	0,652	0,140	0,778	0,148
C14:1 c9	1,89	2,90	2,23	2,19	0,766	0,643	0,232	0,201
C15:0 <i>iso</i>	0,99	1,51	0,97	0,99	0,445	0,257	0,243	0,290
C15:0	2,04 ^a	2,18 ^a	1,18 ^b	1,29 ^b	0,285	<0,001	0,461	0,926
C16:0	19,7	20,3	23,2	21,1	1,79	0,058	0,452	0,215
C16:1 c9	5,75	6,43	5,10	4,74	1,110	0,059	0,780	0,370
C17:0	1,79 ^{ab}	2,07 ^a	1,47 ^b	1,28 ^b	0,218	0,001	0,730	0,750
C17:1 c10	1,01	1,56	1,00	0,96	0,585	0,318	0,411	0,340
C20:0	1,03	0,95	1,02	0,92	0,108	0,736	0,126	0,833
<i>iso</i> + C impar	6,36 ^a	6,94 ^a	4,75 ^b	4,98 ^b	1,054	0,009	0,479	0,758
Total AG C18	60,8 ^{ab}	59,0 ^b	61,6 ^{ab}	65,3 ^a	2,26	0,022	0,513	0,064
Perfil de C18 (% del total de AG C18)								
C18:0 <i>iso</i>	1,35	1,37	0,79	0,57	0,305	0,004	0,547	0,507
C18:0	26,3 ^a	19,4 ^{ab}	18,4 ^{ab}	15,7 ^b	5,04	0,043	0,082	0,417
C18:1 t11	5,34	4,19	4,49	2,72	1,704	0,223	0,131	0,730
C18:1 c9	28,2	31,1	36,0	38,6	5,67	0,039	0,402	0,956
C18:1 c12	7,55	6,92	4,82	5,18	1,69	0,042	0,892	0,612
C18:2 t9t12	2,01	2,20	1,73	1,43	0,529	0,074	0,827	0,374
C18:2 c9c12	27,6	27,4	29,0	31,3	5,80	0,433	0,755	0,713
C18:2 c9t11	0,628	0,652	0,432	0,307	0,1479	0,013	0,563	0,397
C18:3 c9c12c15	8,59 ^a	7,24 ^a	4,26 ^b	4,21 ^b	1,016	<0,001	0,249	0,276
Biohidrogenación (%)								
C18:3 c9c12c15	2,1	13,8	27,1	28,7	17,00	0,077	0,516	0,621
C18:2 c9c12	45,9	46,3	49,2	43,3	11,22	0,987	0,680	0,641
C18:1 c9	9,6	0,1	-18,6	-14,9	13,70	0,026	0,719	0,432
Total insaturados C18	26,7	24,8	24,1	21,9	5,66	0,424	0,562	0,961

¹ **Pienso F** = proporción alta de forrajes (henos de gramíneas y de alfalfa) y **Pienso C** = proporción alta de alimentos concentrados (maíz, cebada y soja)

² DER = desviación estándar residual

^{a, b} Dentro de una misma línea, las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos ($P < 0,05$, prueba de Tukey)

4.2.3.2 Perfil de ácidos grasos de cadena larga en la digesta ruminal

El efecto del tipo de pienso (F o C) y del pH del medio (alto o bajo) sobre el perfil de ácidos grasos en la digesta ruminal se recoge en la Tabla 10. La interacción entre los factores considerados no fue significativa ($P > 0,05$) en ningún caso.

La composición del pienso causó mayores variaciones que el pH en el perfil lipídico en la digesta ruminal. Así, las proporciones de los ácidos grasos saturados C15:0 y C17:0 fueron menores ($P < 0,05$) con el pienso C que con el pienso F. La suma de ácidos grasos C18 fue mayor ($P < 0,05$) con el pienso F que con el pienso C. Como proporción del total de ácidos grasos C18, el ácido saturado C18:0, el monoinsaturado C18:1 y los poliinsaturados C18:2 y C18:3 fueron mayores ($P < 0,05$) con el pienso C que con el pienso F. Sin embargo, la proporción de C18:1 en la digesta fue mayor ($P < 0,05$) con el pienso F. La biohidrogenación de ácido oleico fue mayor ($P < 0,05$) con el pienso C, mientras que la del ácido linolénico tendió a ser mayor ($P < 0,10$) con el pienso F.

El pH en el medio de cultivo no afectó de forma significativa a las proporciones de ácidos grasos en la digesta ni a la hidrogenación ruminal de los mismos, observándose únicamente una tendencia ($P < 0,10$) a una menor proporción de C18:0 cuando se redujo el pH en los fermentadores.

4.2.4 DISCUSIÓN

4.2.4.1 Digestión del sustrato, patrón de fermentación y síntesis de proteína microbiana en el rumen

El presente experimento se planteó para establecer el efecto de la composición del pienso empleado como sustrato de fermentación, con una alta proporción de concentrado o de forraje, y el pH al cual ocurre la fermentación ruminal, sobre los parámetros de fermentación y sobre el perfil de ácidos grasos de cadena larga dentro de fermentadores RUSITEC. El efecto de ambos tratamientos se discutirá por separado.

4.2.4.1.1 Efecto del tipo de pienso

En los fermentadores RUSITEC se considera que la desaparición de la materia contenida en las bolsas representa la degradación de sustrato por los procesos de digestión y fermentación microbianas. En el presente experimento se empleó el mismo inóculo en todos los tratamientos, independientemente del pienso empleado como sustrato de fermentación. De este modo, las condiciones iniciales del experimento fueron homogéneas en todos los tratamientos, aunque es posible que el proceso de adaptación de los microorganismos a los dos piensos se vea afectado por la composición de la dieta con la que se alimentó a los animales donantes de inóculo ([Tejido y col., 2002](#); [Mould y col., 2005](#); [Serment y col., 2016](#)). La mayor desaparición de la MO correspondió al Pienso C, lo cual puede explicarse teniendo en cuenta la composición de ambos piensos. El pienso C contiene una mayor proporción de cereales (39 % contra 10 %) y una menor proporción de forrajes (32 % contra 78 %) que el pienso F. Puesto que los cereales, concentrados amiláceos, se degradan en el rumen a un mayor ritmo y en mayor medida que los forrajes, ricos en fibra, la mayor digestibilidad de la MO de la dieta concentrada es un resultado esperable. No obstante, en un experimento en el que se empleó el RUSITEC para comparar la fermentación de dietas altas en forraje con dietas altas en concentrado, [Martínez y col. \(2010\)](#) no observaron diferencias en la digestibilidad de la materia seca entre ambas dietas, aunque si apreciaron que la digestibilidad de la materia seca fue mayor en las dietas que incluían como fuente de fibra el heno de alfalfa que en las que incluían heno de gramíneas, estableciendo así que la fuente de fibra es un factor que

afecta a la amplitud de la fermentación. Sin embargo, y a diferencia del presente estudio, en el experimento de [Martínez y col. \(2010\)](#) la digestibilidad de la FND fue mayor en las dietas con una mayor proporción de forraje, y dentro de estas, fue mayor en la que contenía heno de gramíneas que en la que contenía heno de alfalfa. La digestibilidad de la FAD fue mayor también en las dietas con mayor contenido de forraje, y fue particularmente alta cuando se incluyó como forraje un heno de gramíneas. Así pues, en el presente trabajo, el mayor coeficiente de desaparición de la celulosa en el pienso C podría estar relacionado con las fuentes de fibra y sus proporciones dentro de los piensos.

En Pienso C, el heno de alfalfa constituyó el 17 %, mientras que en el pienso F solo fue 5 %. Por otra parte, la pulpa de remolacha representó una proporción mayor en el pienso C (7,6 %) que en el pienso F (2,2 %), y se sabe que esta materia prima es rica en fibra soluble y que la degradación de su FND es casi completa a las 48 horas de incubación ([DePeters y col., 1997](#)). Además, la proporción de heno de gramínea es menor en el pienso C (14,5 %) que en el pienso F (72,7 %). Esta diferencia en la composición de los piensos se refleja también en un menor contenido de lignina en el pienso C que en el pienso F, y se sabe que este compuesto es refractario a la degradación e interfiere con la degradación de otros compuestos de la pared celular ([Fukushima y col., 2015](#)).

La mayor producción de gases de fermentación observada con el pienso C que con el pienso F concuerda con los mayores coeficientes de desaparición de la materia orgánica.

La degradación de los carbohidratos estructurales normalmente da lugar a una mayor producción de acetato y de metano ([Russell, 2002](#)). Sin embargo, en el presente experimento no se observó que la producción de metano (por g de materia orgánica fermentada) ni la de acetato fuesen mayores con el pienso F que con el pienso C. Este resultado contrasta con el obtenido por [Martínez y col. \(2010\)](#). Estos autores, empleando el RUSITEC, obtuvieron una mayor concentración de acetato en el rumen con dietas con mayor contenido en fibra que con las dietas altas en concentrado. Sin embargo, en línea con los resultados del presente trabajo, con ambos tipos de dieta se observaron concentraciones ruminales de propionato similares.

En el presente trabajo, la ratio acetato : propionato fue menor el pienso F que con el pienso C. Nuestros resultados difieren de los observados por [Martínez y col. \(2010\)](#), quienes, empleando el RUSITEC, obtuvieron una ratio acetato : propionato menor con la dietas altas en concentrado que con las dietas más forrajeras. No obstante, estos autores ([Martínez y col. \(2010\)](#)) también observaron que el tipo de forraje afecta a la ratio acetato : propionato, que fue menor empleando como forraje heno de alfalfa (2,08) que empleando heno de gramíneas (2,31). Por otra parte, se ha observado en estudios *in vitro* que, además de la dieta, el inóculo es un factor que afecta a la ratio acetato : propionato. Así, es mayor en el caso de dietas de heno que en caso de dietas de maíz (2,7 a 1, respectivamente) y también es mayor cuando el inóculo proviene de animales que no están adaptados a dietas ricas en almidón que cuando el inóculo proviene de animales adaptados a dietas ricas en almidón (3 contra 2,5, respectivamente) ([Russell, 1998](#)). A diferencia de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, [Mackie y Gilchrist \(1979\)](#) observaron que la ratio acetato : propionato disminuía al aumentar la proporción de concentrado en la dieta (hasta 71 %), y que la relación bacterias amilolíticas : bacterias utilizadoras de lactato se equilibraba, mientras que con una dieta de forraje la relación era 10:1.

La inesperada ratio acetato : propionato observada con el pienso C estuvo asociada a un atípico predominio del butirato sobre el propionato. Otros trabajos también han registrado esta particularidad ([Broudiscou y col., 2014](#)). Utilizando fermentadores, [Fuentes y col. \(2009\)](#) observaron que una dieta alta en concentrado tenía mayor producción de butirato que una dieta alta en forraje, y, además, la diferencia se acentuaba a pH más elevados. Con un pH de 6,44 las proporciones de butirato (mol/100 mol de AGV) eran 15,5 para la dieta más concentrada y 11,4 para la más forrajera, mientras que con un pH de 5,6 las proporciones fueron 13,4 para la dieta más concentrada y 12,6 para la más forrajera. Estos resultados parecen sugerir que la población de bacterias productoras y/o la producción de butirato encuentran condiciones muy propicias para su desarrollo cuando confluye una dieta alta en concentrado, especialmente en un medio con un elevado poder tampón que evita el descenso del pH que normalmente ocurre en el animal. Es interesante destacar que en las bacterias

productoras de butirato se distinguen dos grupos: un grupo que participa en la biohidrogenación y otro que no lo hace ([Belenguer y col., 2010](#)). El aumento en la producción de butirato se ha asociado también a la suplementación de la dietas con algas marinas ([Boeckaert y col., 2008](#)) y moderados niveles de adición de aceite de pescado (10 g/kg de MS), pues niveles más altos de suplementación (30 g/kg de MS) lo han deprimido ([Palmquist y Griinari, 2006](#)). Además de una elevada producción de butirato, en los fermentadores también se ha observado una producción de AGV de 5 y 6 C sensiblemente mayor de la que se ha indicado en estudios *in vivo*. Esta elevada producción de valerato y caproato en fermentadores RUSITEC también ha sido advertida por otros autores ([Martínez y col., 2010](#)). No se ha podido establecer una causa que explique este proceso, si bien es posible que, en este tipo fermentadores, cuando se incuban alimentos concentrados en un medio fuertemente amortiguado que evita el descenso de pH al acumularse los AGV como productos finales de la fermentación, los AGV de cadena más corta (acético y propiónico) se utilicen como precursores de AGV de cadena más larga (butírico, valérico, caproico). En este sentido, se ha observado que bacterias ruminales de las especies *Eubacterium pyruvativorans* o *Clostridium kluyveri* ([Wallace y col., 2003](#)) o del género *Megasphaera* sp. ([Jeon y col., 2016](#)), al ser cultivadas en distintos medios *in vitro*, son capaces de sintetizar ácidos grasos de cadena media (de 5 a 8 C) a partir del acético y el propiónico formados desde el pirúvico por fermentación anaerobia. Este proceso explicaría la elevada proporción molar de AGV de 4, 5 y 6 C en la digesta de fermentadores RUSITEC. Además, la utilización de acético y propiónico en estos procesos cambiaría de forma manifiesta sus proporciones molares y la ratio entre ambos AGV de cadena corta en la digesta.

Con el pienso C también se observó una mayor concentración de lactato que con el pienso F, lo que puede ser el resultado de una mayor producción de lactato, una menor utilización de este metabolito, o que se presenten ambos fenómenos simultáneamente ([Mackie y col., 1984](#)). La fermentación de los hidratos de carbono en el rumen conduce a la formación de AGV como producto final y ácido láctico como metabolito intermediario, y la producción de ácido láctico se ha relacionado con la disminución del pH ruminal ([Dijkstra y col., 2012](#)). A diferencia de nuestros resultados, [Martínez y col. \(2010\)](#) no observaron

diferencias en la producción de lactato entre dietas altas en forraje y altas en concentrado en fermentadores RUSITEC, pero las ovejas que consumieron esas mismas dietas si presentaron concentraciones de lactato en el medio ruminal diferentes, mayores para las dietas altas en concentrado que para las dietas forrajeras. Normalmente, se considera que con dietas altas en concentrado usadas *in vivo* la acumulación de lactato resulta de su mayor producción y de una disminución de las bacterias que lo metabolizan, principalmente *Megasphaera elsdenii* (se estima que metaboliza del 60 a 80 % del lactato) debido a su sensibilidad a la disminución del pH ([Nagaraja y Titgemeyer, 2007](#); [Long y col., 2014](#)). Sin embargo, en los sistemas de fermentación *in vitro*, la bajada del pH con las dietas concentradas no suele ser tan acusada, debido a la infusión de saliva artificial con bicarbonato.

En definitiva, en este trabajo, con el pienso C, a diferencia de lo observado con el pienso F, confluyen una elevada ratio acetato : propionato, un predominio del butirato sobre el propionato y una alta producción de lactato. En condiciones de fermentación *in vitro*, usando liquido ruminal de animales alimentados con diferentes dietas y añadiendo lactato, se han observado altos niveles de butirato como resultado de la metabolización de lactato ([Satter y Esdale, 1968](#)). No obstante, también se observó que la producción AGV dependió del pH, la producción de acetato fue más alta a pH 7,4, la de propionato a 6,8 y la de butirato a 6,2. Dado que en nuestro trabajo se apreció un descenso del pH al incubar el pienso C, se puede plantear que la particular producción de butirato en la dieta concentrada es atribuible principalmente a las condiciones de fermentación y a la naturaleza de la dieta. Un bajo contenido de fibra y un alto contenido de almidón (que se metaboliza en lactato), junto con la adición de aceite de girasol, que ejerce un efecto depresor sobre las bacterias ([Maia y col., 2007](#)) podrían dar lugar a la mayor formación de butirato. Además, se ha observado *in vitro* que la adición de glucosa a un medio de cultivo con lactato aumentó sensiblemente la producción de butirato por parte de 4 cepas de *Megasphaera elsdenii* y que la tasa de utilización del lactato fue cinco veces mayor que la de glucosa ([Maroune y Bartos, 1987](#)). No obstante, también se ha registrado que la formación de AGV a partir de lactato aumenta a medida que se incrementa el contenido en carbohidratos rápidamente fermentables en la ración

([Mackie y col., 1984](#)). Por otra parte, también se ha observado que la infusión de ácido láctico a cultivos bacterianos del sistema RUSITEC, con una dieta de 50 % forraje y 50 % concentrado ([Bekendorf y Abel, 1996](#)), ocasiona disminución en la ratio acetato : propionato.

En lo que se refiere al metabolismo nitrogenado, la concentración de amoníaco fue mayor en la dieta concentrada, con mayor contenido de proteína bruta, que en la dieta forrajera, concordando con los resultados de [Martínez y col. \(2010\)](#). Sin embargo, no se observó efecto de la dieta sobre la eficiencia de síntesis microbiana.

4.2.4.1.2 Efecto del pH

El tipo de saliva infundida no afectó a la digestibilidad de la FND, ni a la de la FAD o de la celulosa, lo cual podría atribuirse a que, incluso con la menor proporción de bicarbonato, el poder amortiguador de la saliva impidió la disminución del pH inferior a 6,2, que es el punto crítico por debajo del cual se empiezan a hacer evidentes efectos negativos del pH sobre las bacterias celulolíticas y, como consecuencia, sobre la digestibilidad ([Satter y Esdale, 1968](#); [Russell, 1998](#); [Kozloski y col., 2008](#)). Además, el efecto negativo sobre la amplitud de la digestión de la fibra sólo llegaría a manifestarse si la disminución del pH se prolonga durante un período suficientemente largo. Efectivamente, incluso utilizando una saliva normal, el pH de los fermentadores puede disminuir como consecuencia de la acumulación de los productos finales de la fermentación. Utilizando saliva normal en el RUSITEC, [Martínez y col. \(2010\)](#) observaron una variación del rango de pH comprendido entre 6,41 y 6,90, siendo mayor en las dietas altas en forraje y, dentro de ellas, en las dietas con alfalfa. Por otra parte, [Hu y col. \(2004\)](#) observaron en experimentos *in vitro* que la degradación de la celulosa aumentaba al aumentar el pH y que el máximo valor, cercano al 78 %, se alcanzaba para valores de pH comprendidos entre 6,8 y 7,3. El efecto negativo del pH sobre la fermentación microbiana ha sido asociado con el intervalo de tiempo durante la cual el pH está por debajo de cierto valor, y también con la magnitud de la reducción ([Cerrato-Sanchez y col., 2008](#)). No obstante, [Farenzena y col. \(2014\)](#) observaron una menor degradabilidad de la materia seca y de la FND en fermentaciones mantenidas a un pH de 6,5, en comparación con un pH de 7,0, y lo relacionaron con una disminución de la adhesión de las bacterias al

substrato (0,67 contra 0,57 mg de proteína microbiana/g de materia seca, respectivamente), sin apreciar diferencias en la actividad de las enzimas fibrolíticas (carboximetil-celulasa y xilanasas).

En el presente experimento, sin embargo, el pH del medio de cultivo sí incidió sobre la digestibilidad de la proteína y, sobre todo, de la grasa. [Cantalapiedra-Hijar y col. \(2011\)](#) también observaron un efecto significativo del pH de los fermentadores sobre la degradación de la proteína bruta; de forma que con valores de pH entre 6,2 y 6,5 la degradabilidad de la proteína osciló entre un 59 y un 78 %, mientras que al reducir el pH hasta valores entre 5,70 y 6,08 (aumentando la cantidad de alimento por unidad de volumen de la solución amortiguadora) la degradabilidad de la proteína también disminuyó a valores entre un 52 y un 65 %. [Fuentes y col. \(2009\)](#) también observaron un efecto similar del pH sobre la degradación de la proteína; con un pH de 6,4 la degradación estuvo entre un 55 y un 58 %, mientras que con el pH de 5,6 la degradación cayó hasta valores comprendidos entre un 40 y un 43 %. La disminución en el coeficiente de desaparición de la grasa al disminuir el pH, sugiere que la disminución del pH desde 6,82 hasta 6,44 afecta negativamente la lipólisis. En otros estudios *in vitro* [Van Nevel y Demeyer \(1996\)](#) observaron una disminución de la lipólisis al disminuir el pH, disminución que se hace más drástica con valores de pH por debajo de 6,0. Además, la inhibición fue mayor cuando se añadió aceite al pienso, resultados que atribuyeron a un posible efecto negativo del pH y del aceite sobre el crecimiento y el metabolismo de las bacterias lipolíticas o a una interferencia con la actividad de sus lipasas. En este sentido, [Fuentes y col. \(2009\)](#) observaron que con un pH de 5,6 en el medio de cultivo, la bacteria *Anaerovibrio lipolytica* disminuía su presencia hasta casi desaparecer al cabo de cinco días. Además, [Zened y col. \(2013\)](#) observaron que el C18:2 c9c12 contenido en el aceite añadido era más accesible para las bacterias que el C18:2 c9c12 que formaba parte de los alimentos, dentro de las células vegetales.

La mayor producción de gas observada con el pH más elevado podría relacionarse con la mayor desaparición de la materia orgánica, proteína y grasa.

El pH no afectó a la producción de metano; a diferencia de lo descrito por [Russell \(1998\)](#) quien observó que la disminución en el pH ocasionaba una disminución en la capacidad de los microorganismos metanogénicos para captar

el hidrógeno del medio ruminal, aunque dicho efecto fue observado cuando el pH cayó a valores por debajo de 5,5. Otros autores observaron *in vitro* que con dietas exclusivamente forrajeras, el pH ruminal se mantenía más o menos constante y próximo a la neutralidad (6,7 a 6,9), mientras que con dietas formadas sólo por concentrado el pH disminuía drásticamente después de la ingestión de alimento (5,5) y los microorganismos ruminales de este medio perdían temporalmente la capacidad para convertir el CO₂ y el H₂ en metano ([Van Kessel y Russell, 1996](#)). Sin embargo, [Hunerberg y col. \(2015\)](#), mediante estudios *in vivo*, no apreciaron un efecto del pH ruminal (con descensos hasta valores por debajo de 5,2) sobre la producción de metano, por lo que se sugiere la existencia de mecanismos que permiten la supervivencia de los microorganismos metanógenos en condiciones de acidosis prolongadas durante periodos relativamente largos. Entre los mecanismos sugeridos se incluyen un eventual cambio de la estructura de la comunidad microbiana hacia cepas más tolerantes, o la protección mediante biopelículas o por los protozoos.

En el presente trabajo, el pH también afectó la producción total de AGV y de acetato, que fueron menores con el pH más bajo (6,4). [Russell \(1998\)](#) también observó que al disminuir el pH disminuye la producción de acetato, aunque en su caso los sustratos fermentados fueron heno y maíz grano, y el pH se varió en un rango más amplio (entre 6,6 y 5,5) al del presente trabajo. Sin embargo, como ya se ha comentado, en el presente trabajo, el pH pudo haber disminuido a valores inferiores a 6,4 en algunos momentos del día, como consecuencia de la producción de AGV. Por otra parte, [Broudiscou y col. \(2014\)](#) señalaron que, en experimentos *in vitro*, la adaptación del inoculo al sustrato de fermentación (forraje o almidón) afecta a la producción de AGV cuando la fermentación se realiza a diferentes pH (5,8, 6,3 y 6,8). Con microorganismos adaptados a un sustrato fibroso predominó la producción de acetato y el pH alto estimuló la producción de propionato y butirato, y claramente inhibió la producción de lactato. En los cultivos adaptados a carbohidratos rápidamente fermentables, la producción de propionato y acetato sólo llegó a suponer el 40 % de la producción de AGV, y la ratio acetato : propionato varió con el pH, disminuyendo desde 5,3 con un pH ácido de 5,8 hasta 3,2 con un pH de 6,8.

En el presente experimento, el pH afectó a la ratio acetato : propionato, que disminuyó al reducirse el pH, en particular con el pienso C. De forma similar, [Fuentes y col. \(2009\)](#) observaron un marcado efecto del pH sobre la ratio acetato : propionato que, con dietas bajas en concentrado, fue 3,4 para un pH 6,4 y 1,9 para un pH 5,6, mientras que con dietas altas en concentrado fue de 2,6 para un pH 6,4 y de 1,2 para un pH 5,6. En dicho estudio la disminución en la ratio acetato : propionato asociada a un menor pH estuvo acompañada de una disminución muy marcada de la digestión de la FND y de la producción total de AGV, que no se observaron en el presente trabajo. Además, [Bhatta y col. \(2006\)](#) observaron *in vitro* que una disminución del pH desde 7,0 hasta 6,0 disminuyó la relación acetato : propionato desde 2,0 hasta 1,5, pero también afectó negativamente a la producción de gas (1,8 contra 1,2 L/d), la degradabilidad de la MS (60 contra 42 %) y de la PB (76 contra 55 %), y la producción de AGV (62 contra 35 mM). En el presente trabajo, aunque el rango de variación fue más estrecho, también se observó la disminución en la producción de AGV, la producción de gas y la degradabilidad de la MO y de la proteína.

Por otro lado, la mayor concentración de amoníaco en el medio de cultivo con un pH más alto (6,82) parece relacionada con la mayor desaparición de proteína observada en este tratamiento, especialmente con el pienso C. Este resultado concuerda con lo observado por [Calsamiglia y col. \(2002\)](#), quienes registraron que con un pH bajo se reducía la degradación de la proteína y, consecuentemente, la concentración de amoníaco en simuladores de la fermentación ruminal.

4.2.4.2 Perfil de ácidos grasos de cadena larga

4.2.4.2.1 Efecto del tipo de pienso

Las bacterias del género *Butyrivibrio* participan de forma importante en los procesos de biohidrogenación ruminal ([Maia y col., 2007](#)). Por lo tanto, la reducción en la proporción de C18:0 que se observó con el pienso C podría relacionarse con eventuales efectos de la dieta sobre este grupo bacteriano. Efectivamente, [Wanapat y col. \(2014\)](#) observaron, en un experimento *in sacco*, que con una dieta con una relación forraje:concentrado de 80:20 aumentaba la población de *Fibrobacter succinogenes* y la de *Megasphaera elsdenii*, utilizadora

de lactato y productora de C18:2 *t*10*c*12. Con las dietas con un 80 o un 60 % de forraje también aumentó la población de *Butyrivibrio fibrisolvens*, considerada la principal productora de C18:2 *c*9*t*11, mientras que las poblaciones de *Ruminococcus albus* y *R. flavefaciens* no variaron al cambiar la dieta. De igual forma, [Mrazek y col. \(2006\)](#) observaron que con dietas con un mayor contenido en fibra se incrementa la población de *Butyrivibrio* sp. en el rumen, mientras que cuando se incluyen en la ración ingredientes con una alta concentración energética se reduce drásticamente este grupo bacteriano. Además, [Zened y col. \(2013\)](#) concluyeron que *Butyrivibrio fibrisolvens* es la especie bacteriana productora de C18:1 *t*11 mejor conocida y se sabe que es muy sensible a la fermentación de dietas con elevado contenido en almidón. Dado que las bacterias productoras de C18:1 *t*11 son a la vez productoras de C18:2 *c*9*t*11, es factible pensar que la dieta alta en concentrado pudo haber afectado negativamente los recuentos de dichas bacterias en los fermentadores RUSITEC.

En nuestro estudio, aunque las proporciones de C18:2 *c*9*c*12 fueron menores y las de C18:1 *t*11 mayores en la digesta de fermentadores alimentados con el pienso F, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Tampoco se observó un efecto significativo del tipo de pienso sobre la hidrogenación ruminal de C18:2 *c*9*c*12. Sin embargo, con el pienso F aumentó de forma significativa la proporción de C18:2 *c*9*t*11. Como ya ha sido mencionado, con el pienso C predominó la producción de butirato sobre la propionato. Este hecho parece indicar que, tal y como describe [Jenkins y col. \(2008\)](#), aunque todas las bacterias con capacidad para metabolizar el C18:2 *c*9*c*12 y producir cantidades substanciales de C18:2 *c*9*t*11 y C18:1 *t*11 también producen butirato, no todas las bacterias productoras de butirato pueden formar C18:2 *c*9*t*11 o C18:1 *t*11. [Goel y col. \(2009\)](#) también concluyeron que no todas las bacterias productoras de butirato son activas en la biohidrogenación. Así, observaron que, sin modificar la producción de C18:1 *t*10+*t*11, la adición de 20 mg de ácido cáprico resultó en un predominio en la producción del butirato sobre el propionato, acompañado de un efecto negativo sobre la proporción de C18:2 *c*9*c*12 y de C18:3 *c*9*c*12*c*15 y de la biohidrogenación de dichos ácidos grasos. Estos efectos no ocurrieron con dosis inferiores (10 mg) o superiores (30 mg) de ácido cáprico, lo que indica que este proceso se desencadena en condiciones muy particulares.

En el presente trabajo hay una menor proporción de C18:0 con el pienso C que con el pienso F, junto con una menor proporción de C18:2 c9t11, pero no se apreciaron diferencias entre las dos dietas en la concentración de C18:1 t11. Estos resultados, en conjunto, sugieren que la biohidrogenación también puede estar ocurriendo a través de rutas metabólicas alternativas a la producción de C18:1 t11, involucrando la producción de C18:2 t10c12 y C18:1 t10 que no fueron objeto de seguimiento en este trabajo; pero que se han relacionado con la biohidrogenación de las grasas en dietas altas en concentrado. [Gudla y col. \(2012\)](#) estudiaron el efecto de la dieta sobre la biohidrogenación y observaron que con una dieta alta en concentrado aumentó la proporción de C18:1 t10, y que, al igual que en el presente trabajo, disminuía la proporción de C18:0 y de C18:2 c9t11, aunque también advirtieron una disminución en la proporción de C18:1 t11. Además, con la dieta alta en concentrado se aumentaba la concentración de C18:1 c9 y de C18:2 c9c12, como también ocurrió en el presente trabajo.

La naturaleza de la dieta ejerce una fuerte influencia sobre la biohidrogenación. [Ferlay y col. \(2003\)](#) estudiaron la evolución de los metabolitos de la biohidrogenación empleando distintas dietas compuestas por ensilado de gramíneas o de maíz y suplementando con distintos aceites (girasol, lino y pescado) y observaron que durante los primeros 13 días aumentaba levemente la producción de C18:1 t10, para aumentar considerablemente entre los días 13 y 20 hasta alcanzar el 2,0 y el 4,5 % de total de ácidos grasos en las dietas de ensilado de gramíneas y maíz, respectivamente. A partir de estos resultados concluyeron que la cinética de aparición del C18:1 t10, C18:1 t11 y C18:2 c9t11 depende la interacción entre la naturaleza del forraje y el tipo de aceite suplementado. [Zened y col. \(2013\)](#) observaron que las concentraciones de C18:2 c9t11 y de C18:2 t10c12 en el rumen de vacas alimentadas con ensilado de maíz, heno de alfalfa, harina de soja y aceite de girasol alcanzaban el 80 y el 3 % del total de C18:2 conjugados, respectivamente. Sin embargo, con una ración más concentrada en la que en lugar del heno se añadían cereales (48,5 % de trigo-cebada), la proporción de C18:2 c9t11 disminuyó hasta 7 %, mientras que la de C18:2 t10c12 aumentó hasta un 53 %. El cambio de una dieta más forrajera a una más concentrada estuvo acompañado por un cambio en el pH ruminal que fue de

6,5 en el primer caso y de 5,7 en el segundo. En el presente trabajo el rango de variación del pH fue menor, pero es posible especular que con la dieta concentrada el pH pudo ser inferior a 6,0 durante una parte de día, lo cual podría explicar que también se observase una menor concentración de C18:2 c9t11 con esta dieta.

Por otra parte, además del efecto de la relación forraje : concentrado sobre el perfil de ácidos grasos de cadena larga, distintos autores también han estudiado el efecto de la naturaleza de la fibra de la dieta. Así, [Ribeiro y col. \(2005\)](#) observaron que la concentración de C18:1 t10 fue menor con raciones con alfalfa verde que con heno de otras especies forrajeras, pero no hubo diferencias en la proporción de C18:1 t11 entre ambas dietas. Además, también observaron que la disponibilidad de azúcares afecta a la biohidrogenación, ya que, en repuesta a la suplementación con sacarosa, el flujo de C18:1 t12 al duodeno se incrementaba linealmente, mientras que el flujo de C18:1 c12 y total de C18:1 cis tenía una respuesta cuadrática. De igual forma, observaron que la biohidrogenación total y la biohidrogenación del C18:2 c9c12 y del C18:3 c9c12c15 decrecieron linealmente con la sacarosa. Estos autores, finalmente, plantean que el efecto de la sacarosa sobre la biohidrogenación es causado por un cambio en las poblaciones bacterianas mediante mecanismos que son independientes del pH. En el presente trabajo también se observan efectos independientes de la dieta sobre la biohidrogenación, que se ve favorecida por la dieta con mayor cantidad de forraje.

En relación con el pienso C, la concentración de C18:2 c9c12 en el rumen fue mayor que con el pienso F, aunque la diferencia no fue significativa. [Maia y col. \(2010\)](#) demostraron *in vitro* que el C18:2 c9c12 tiene efectos bacteriostáticos sobre *B. fibrisolvens*. Sin embargo, de acuerdo con los resultados de [Zened y col. \(2013\)](#) eso no significa que la adición de C18:2 c9c12 (aceite de girasol) afecte necesariamente a la biohidrogenación que conduce a la formación de C18:2 c9t11 y C18:1 t11, pues el efecto depresor del aceite sobre la producción de C18:1 t11 solo ocurrió al añadir el aceite a una dieta rica en almidones. Además, [Shingfield y col. \(2005\)](#) apreciaron diferencias en el proceso de biohidrogenación entre dietas con mayor contenido en forraje o en alimento concentrado suplementadas con una mezcla de aceite de girasol y pescado. Con la dieta con una mayor

proporción de concentrado la proporción de C18:2 *c9t11* fue menor que con la dieta con mayor contenido en fibra, mientras que las proporciones de C18:2 *t9c11* y de C18:2 *t10c12* fue mayor. Por tanto, la dieta basal es un factor determinante del perfil de ácidos grasos en la digesta al suplementar con aceite de pescado y aceite de girasol. Por otra parte, también se ha observado que la adición de grandes cantidades de almidón junto con aceite de girasol aumentó la proporción de C18:1 *t10* a expensas de C18:1 *t11* (66 contra 11 % del total de C18:1 *trans*, respectivamente), mientras que, con la dieta rica en almidón, pero sin aceite, la concentración de C18:1 *t10* fue menor que la de C18:1 *t11* (12 contra 50 % del total de C18:1 *trans*). En ambos casos el pH ruminal fue de 5,7 por lo que las diferencias entre ambas dietas, en este estudio, fueron independientes del pH ([Zened y col., 2013](#)).

4.2.4.2.2 Efecto del pH

En el presente trabajo se observó que la biohidrogenación disminuyó con el pH 6,44, como se desprende de la menor concentración de C18:0. Además, la proporción de C18:1 *t11* también fue menor con el pH más bajo. No obstante, las diferencias no alcanzaron el nivel de significación estadística. Estos resultados están en línea con los obtenidos por [Wang y Song \(2003\)](#), quienes usaron semilla de lino o de colza y observaron que aumentando el pH en el medio de cultivo se aumentaba la proporción de C18:1 *t11* al suplementar cualquiera de los dos aceites, y la de C18:1 *c9t11* aumentaba cuando se añadía colza, respuesta que no se observó en el presente trabajo. Wang y Song (2003) también observaron la disminución de C18:2 *c9c12* y C18:3 *c9c12c15* al aumentar el pH. No obstante, estos autores usaron un rango de pH más amplio y un límite inferior de pH más bajo. Todo ello sugiere que los microorganismos que generan ácidos grasos C18:0 y C18:1 mediante la hidrogenación en el rumen son más sensibles a la disminución del pH que los microorganismos que producen C18:2 *c9t11*, o bien que al disminuir el pH se propicia la isomerización del C18:2 *c9t11*. En el experimento con el lino y la colza antes mencionado ([Wang y Song, 2003](#)) también se observó que el proceso de biohidrogenación fue más lento con el pH bajo (con valores entre 4.5 y 5.3). Por otro lado, [Fuentes y col. \(2009\)](#) observaron que la formación de C18:1 *t10* aumentaba con un bajo pH ruminal, característico de dietas bajas en forraje y altas en concentrado.

En el presente trabajo se observó un efecto del pH sobre la producción de C18:0 ya que la proporción de este ácido graso en la digesta fue menor al disminuir el pH, al igual que [Fuentes y col. \(2009\)](#), aunque estos autores compararon dos valores de pH más extremos (6,4 y 5,6) y observaron una marcada disminución del C18:0 al reducir el pH (disminuyendo desde 59-62 % hasta 10-15 %). También observaron que al disminuir el C18:0 aumentaba el C18:2 c9c12 en el medio de cultivo; sin embargo, en su caso no observaron diferencias en la concentración de C18:0 entre la dieta alta en forraje y la dieta alta en concentrado, si bien ninguna de las dos dietas incluyó forraje de gramíneas. Adicionalmente, al igual que en presente trabajo, se ha registrado que la disminución del pH puede disminuir la formación de C18:1 t11. [Fuentes y col. \(2011\)](#) comprobaron que, en comparación con un pH ruminal de 6,4, con un pH de 5,7 disminuyeron las proporciones de C18:1 t11 (9 contra 2 %) y de C18:2 c9t11 (1,4 contra 0,1 %) en el total de ácidos grasos C18, y aumentaron las de C18:1 t10 (1,6 contra 21 %) y de C18:2 t10c12 (0,3 contra 0,7 %). En el mismo sentido, [Ribeiro y col. \(2007\)](#), en un estudio *in vitro* en el que emplearon dos soluciones amortiguadoras (una que permitió un rango de pH entre 7,0 y 6,5, y otra formulada para que el rango de pH se situase entre 6,6 y 5,8), confirmaron que con el pH más bajo disminuía la tasa de biohidrogenación de C18:2 y C18:3, pero no la del C18:2 c9t11.

Por otra parte, la disminución del C18:0 también puede estar asociada a una disminución de la actividad lipolítica. [Fuentes y col. \(2009\)](#) observaron que con un pH de 5,6 en el medio de cultivo la población de *A. lipolytica* disminuyó casi hasta desaparecer al cabo de 5 días. Además, la cepa de *B. fibrisolvens* involucrada en la formación de C18:1 t11 también fue menor con este pH ácido, pero de manera más acusada con una dieta con mayor contenido en concentrado, mientras que el pH no afectó a las cepas de *B. fibrisolvens* que provocan la saturación completa hasta ácido esteárico. [Fuentes y col. \(2011\)](#) apreciaron que con un pH más bajo (5,7 contra 6,4) disminuía la lipólisis, especialmente del C18:2 c9c12 y también se reducía su biohidrogenación. Además, también variaban las poblaciones bacterianas, disminuyendo *A. lipolytica* y cepas de *Butyrivibrio* formadoras de C18:1 t11, y aumentando las cepas de *Butyrivibrio* formadoras de C18:0. [Troegeler-Meynadier y col. \(2003\)](#) concluyeron que la

isomerización de los C18:2 era fuertemente inhibida por un pH ruminal ácido, y sugirieron que la optimización de la producción de C18:2 *c9t11* se puede obtener con un pH ruminal cercano a la neutralidad y con la adición de C18:2 *c9c12*. En el mismo sentido, [Zened y col. \(2013\)](#) confirmaron que el pH óptimo para la acción de la isomerasa C18:2 *c9c12* de la bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* está entre 7,0 y 7,2. En nuestro estudio, el pH no afectó a la formación de C18:2 *c9t11*, si bien el rango de pH no fue muy amplio. Por otra parte, en condiciones *in vitro*, [Wang y Song \(2001\)](#) no apreciaron diferencias en el pH entre medios de cultivo en los que se fermentó almidón o celulosa, pero si observaron una mayor biohidrogenación de C18:2 *c9c12* cuando se añadió almidón, lo que estuvo relacionado con una mayor síntesis bacteriana. Posteriormente, [Troegeler-Meynadier y col. \(2006\)](#) registraron en pruebas *in vitro* que un pH más bajo (6 contra 7) disminuye la tasa y la eficiencia de isomerización, de forma que con un pH más bajo se inhibió tanto la isomerización de C18:2 *c9c12* como la conversión de C18:1 *t11* a C18:0.

4.2.5 CONCLUSIONES

Cuando se digiere un pienso con una mayor proporción de alimentos concentrados, más digestibles, aumenta la producción de gas de fermentación, la de algunos ácidos grasos de cadena corta (butírico, valérico, caproico e isoácidos) y la de ácido láctico y amoníaco, así como la cantidad total de proteína microbiana sintetizada en el rumen. Sin embargo, no se observan cambios en la producción de metano o en la eficiencia de síntesis de la proteína microbiana. Al aumentar la proporción de alimentos concentrados en el pienso se incrementa la hidrogenación del ácido linolénico y se reduce la del ácido oleico, no observándose variaciones en la del ácido linoleico. Como resultado de estos cambios, se observan variaciones en el perfil de ácidos grasos en la digesta ruminal, de forma que las proporciones relativas de ácido esteárico y de ácido linoleico conjugado (C18:2 c9t11) son más elevadas con una dieta con una mayor proporción de forraje.

Al disminuir el pH ruminal desde 6,9 hasta 6,4 disminuye la digestibilidad del pienso, la producción de gas y la de ácidos grasos de cadena corta, en particular el acético. También disminuye la degradación de la proteína del pienso, disminuyendo la liberación de amoníaco y la formación de isoácidos de cadena corta, aunque sin llegar a afectar a la síntesis de proteína microbiana. No hay cambios ni en la producción de metano ni en la de los ácidos propiónico, butírico y láctico. Con esa disminución del pH no llegan a observarse diferencias ni en la hidrogenación ni en el perfil de ácidos grasos de cadena larga en la digesta ruminal.

4.2.6 BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. (1999). *Official methods of analysis* (16th ed.). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- AOCS. (2008). *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society* (5th ed.). Urbana, IL. U.S.A: AOCS
- Bauman, D. E., and Griinari, J. M. (2001). Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science*, 70, 15-29.
- Bekendorf, T., and Abel, H. (1996). *In vivo* and *in vitro* (Rusitec)-investigations on lactate metabolism in the rumen of sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition-Zeitschrift Fur Tierphysiologie Tierernahrung Und Futtermittelkunde*, 75, 133-141.
- Belenguer, A., Toral, P. G., Frutos, P., and Hervás, G. (2010). Changes in the rumen bacterial community in response to sunflower oil and fish oil supplements in the diet of dairy sheep. *Journal of Dairy Science*, 93, 3275-3286.
- Bhatta, R., Tajima, K., and Kurihara, M. (2006). Influence of temperature and pH on fermentation pattern and methane production in the rumen simulating fermenter (Rusitec). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19, 376-380.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Dijkstra, J., Issa-Zacharia, A., Van Nespen, T., Van Straalen, W., and Fievez, V. (2008). Effect of dietary starch or micro algae supplementation on rumen fermentation and milk fatty acid composition of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91, 4714-4727.
- Broudiscou, L. P., Offner, A., and Sauvant, D. (2014). Effects of inoculum source, pH, redox potential and headspace di-hydrogen on rumen *in vitro* fermentation yields. *Animal*, 8, 931-937.
- Calsamiglia, S., Cardozo, P. W., Ferret, A., and Bach, A. (2008). Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *J. Anim Sci.*, 86, 702-711.
- Calsamiglia, S., Ferret, A., and Devant, M. (2002). Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *Journal of Dairy Science*, 85, 574-579.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Yanez-Ruiz, D. R., Newbold, C. J., and Molina-Alcaide, E. (2011). The effect of the feed-to-buffer ratio on bacterial diversity and ruminal fermentation in single-flow continuous-culture fermenters. *Journal of Dairy Science*, 94, 1374-1384.
- Cerrato-Sanchez, M., Calsamiglia, S., and Ferret, A. (2008). Effect of the magnitude of the decrease of rumen pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *Journal of Animal Science*, 86, 378-383.
- Czerkawski, J. W., and Breckenridge, G. (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (RUSITEC). *British Journal of Nutrition*, 38, 371-384.
- DePeters, E. J., Fadel, J. G., and Arosemena, A. (1997). Digestion kinetics of neutral detergent fiber and chemical composition within some selected by-product feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, 67, 127-140.
- Dijkstra, J., Ellis, J., Kebreab, E., Strathe, A., López, S., France, J., and Bannink, A. (2012). Ruminant pH regulation and nutritional consequences of low pH. *Animal Feed Science and Technology*, 172, 22-33.

- Dilzer, A., and Park, Y. (2012). Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 488-513.
- Farenzena, R., Kozloski, G. V., Mezzomo, M. P., and Fluck, A. C. (2014). Forage degradability, rumen bacterial adherence and fibrolytic enzyme activity in vitro: effect of pH or glucose concentration. *Journal of Agricultural Science*, 152, 325-332.
- Ferlay, A., Capitan, P., Ollier, A., and Chilliard, Y. (2003). *Interactions between nature of forage and oil supplementation on cow milk composition. 3. Effects on kinetics of percentages of milk CLA and trans fatty acids*. Paper presented at the Abstracts of the 54th Annual Meeting of European Association for Animal Production, Rome.
- Fuentes, M., Calsamiglia, S., Fievez, V., Blanch, M., and Mercadal, D. (2011). Effect of pH on ruminal fermentation and biohydrogenation of diets rich in omega-3 or omega-6 fatty acids in continuous culture of ruminal fluid. *Animal Feed Science and Technology*, 169, 35-45.
- Fuentes, M. C., Calsamiglia, S., Cardozo, P. W., and Vlaeminck, B. (2009). Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 92, 4456-4466.
- Fukushima, R. S., Kerley, M. S., Ramos, M. H., Porter, J. H., and Kallenbach, R. L. (2015). Comparison of acetyl bromide lignin with acid detergent lignin and Klason lignin and correlation with *in vitro* forage degradability. *Animal Feed Science and Technology*, 201, 25-37.
- Goel, G., Arvidsson, K., Vlaeminck, B., Bruggeman, G., Deschepper, K., and Fievez, V. (2009). Effects of capric acid on rumen methanogenesis and biohydrogenation of linoleic and α -linolenic acid. *Animal*, 3, 810-816.
- Gomez-Cortes, P., de la Fuente, M. A., Toral, P. G., Frutos, P., Juarez, M., and Hervás, G. (2011). Effects of different forage:concentrate ratios in dairy ewe diets supplemented with sunflower oil on animal performance and milk fatty acid profile. *Journal of Dairy Science*, 94, 4578-4588.
- González, L., Manteca, X., Calsamiglia, S., Schwartzkopf-Genswein, K., and Ferret, A. (2012). Ruminal acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). *Animal Feed Science and Technology*, 172, 66-79.
- Gudla, P., Ishlak, A., and AbuGhazaleh, A. (2012). The effect of forage level and oil supplement on *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Anaerovibrio lipolytica* in continuous culture fermenters. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25, 234-239.
- Hu, Z.-H., Wang, G., and Yu, H.-Q. (2004). Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. *Biochemical Engineering Journal*, 21, 59-62.
- Jenkins, T. C., Wallace, R. J., Moate, P. J., and Mosley, E. E. (2008). Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science*, 86, 397-412.
- Jeon, B. S., Choi, O., Um, Y., and Sang, B.-I. (2016). Production of medium-chain carboxylic acids by *Megasphaera* sp. MH with supplemental electron acceptors. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 129. Retrieve from Doi:10.1186/s13068-016-0549-3

- Kozloski, G., Lima, L., Cadorin Jr, R., Bonnacarrère Sanchez, L., Senger, C., Fiorentini, G., and Härter, C. (2008). Microbial colonization and degradation of forage samples incubated *in vitro* at different initial pH. *Animal Feed Science and Technology*, 141, 356-367.
- Long, M., Feng, W. J., Li, P., Zhang, Y., He, R. X., Yu, L. H., He, J. B., Jing, W. Y., Li, Y. M., Wang, Z., and Liu, G. W. (2014). Effects of the acid-tolerant engineered bacterial strain *Megasphaera elsdenii* H6F32 on ruminal pH and the lactic acid concentration of simulated rumen acidosis *in vitro*. *Research in Veterinary Science*, 96, 28-29.
- Mackie, R. I., and Gilchrist, F. M. C. (1979). Changes in lactate-producing and lactate-utilizing bacteria in relation to pH in the rumen of sheep during stepwise adaptation to a high-concentrate diet. *Applied and Environmental Microbiology*, 38, 422-430.
- Mackie, R. I., Gilchrist, F. M. C., and Heath, S. (1984). An *in vivo* study of ruminal micro-organisms influencing lactate turnover and its contribution to volatile fatty acid production. *The Journal of Agricultural Science*, 103, 37-51.
- Maia, M. R., Chaudhary, L. C., Bestwick, C. S., Richardson, A. J., McKain, N., Larson, T. R., Graham, I. A., and Wallace, R. J. (2010). Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiology*, 10(1), 52. Retrieve from Doi:10.1186/1471-2180-10-52
- Maia, M. R. G., Chaudhary, L. C., Figueres, L., and Wallace, R. J. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91, 303-314.
- Maroune, M., and Bartos, S. (1987). Interactions between rumen amylolytic and lactate-utilizing bacteria in growth on starch. *Journal of Applied Bacteriology*, 63, 233-238.
- Martínez, M. E., Carro, M. D., Cantalapiedra-Hijar, G., Ranilla, M. J., Yáñez-Ruíz, D. R., and Molina-Alcaide, E. (2011). Effect of forage type and forage to concentrate ratio on ruminal fermentation in single-flow continuous-culture and RUSITEC fermenters. In M. J. Ranilla, M. D. Carro, H. Ben Salem, y P. Morand-Fehr (Eds.), *Challenging strategies to promote the sheep and goat sector in the current global context*. (pp. 109-114). Zaragoza CIHEAM / CSIC / Universidad de León / FAO (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 99).
- Martínez, M. E., Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Ramos, S., and Carro, M. D. (2010). Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and RUSITEC fermenters. I. Digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. *Journal of Dairy Science*, 93, 3684-3698.
- McDougall, E. I. (1948). Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheeps saliva. *Biochemical Journal*, 43, 99-109.
- Mould, F. L., Kliem, K. E., Morgan, R., and Mauricio, R. M. (2005). *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 31-50.
- Mrazek, J., Tepšič, K., Avguštin, G., and Kopečný, J. (2006). Diet-dependent shifts in ruminal butyrate-producing bacteria. *Folia Microbiologica*, 51, 294-298.
- Nagaraja, T., and Titgemeyer, E. (2007). Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook 1, 2. *Journal of Dairy Science*, 90, E17-E38.

- Palmquist, D. L., and Griinari, J. M. (2006). Milk fatty acid composition in response to reciprocal combinations of sunflower and fish oils in the diet. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 358-369.
- Ribeiro, C., Karnati, S. K. R., and Eastridge, M. L. (2005). Biohydrogenation of fatty acids and digestibility of fresh alfalfa or alfalfa hay plus sucrose in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 88, 4007-4017.
- Ribeiro, C. V. D. M., Eastridge, M. L., Firkins, J. L., St-Pierre, N. R., and Palmquist, D. L. (2007). Kinetics of fatty acid biohydrogenation *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 90, 1405-1416.
- Russell, J. B. (1998). The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 81, 3222-3230.
- Russell, J. B. (2002). *Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition*. Ithaca, N.Y: Cornell University.
- SAS. (2002). *User's guide: Statistics (release 8.02)*. Cary, NC, USA: SAS Inst., Inc.
- Satter, L. D., and Esdale, W. J. (1968). *In vitro* lactate metabolism by ruminal ingesta. *Applied Microbiology*, 16, 680-688.
- Serment, A., Giger-Reverdin, S., Schmidely, P., Dhumez, O., Broudiscou, L. P., and Sauvant, D. (2016). *In vitro* fermentation of total mixed diets differing in concentrate proportion: Relative effects of inocula and substrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 160-168.
- Shingfield, K. J., Reynolds, C. K., Lupoli, B., Toivonen, V., Yurawecz, M., Delmonte, P., Griinari, J. M., Grandison, A. S., and Beever, D. E. (2005). Effect of forage type and proportion of concentrate in the diet on milk fatty acid composition in cows given sunflower oil and fish oil. *Animal Science*, 80, 225-238.
- Steel, R. G. D., and Torrie, J. H. (1981). *Principles and procedures of statistics: A biometrical approach* (2nd ed.). New York: McGraw-Hill.
- Szczechowiak, J., Szumacher-Strabel, M., El-Sherbiny, M., Pers-Kamczyc, E., Pawlak, P., and Cieslak, A. (2016). Rumen fermentation, methane concentration and fatty acid proportion in the rumen and milk of dairy cows fed condensed tannin and/or fish-soybean oils blend. *Animal Feed Science and Technology*, 216, 93-107.
- Tejido, M. L., Ranilla, M. J., and Carro, M. D. (2002). *In vitro* digestibility of forages as influenced by source of inoculum (sheep rumen versus RUSITEC fermenters) and diet of the donor sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 97, 41-51.
- Toral, P. G., Rouel, J., Bernard, L., and Chilliard, Y. (2014). Interaction between fish oil and plant oils or starchy concentrates in the diet: Effects on dairy performance and milk fatty acid composition in goats. *Animal Feed Science and Technology*, 198, 67-82.
- Tremere, A. W., Merrill, W., and Loosli, J. (1968). Adaptation to high concentrate feeding as related to acidosis and digestive disturbances in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 51, 1065-1072.
- Troegeler-Meynadier, A., Bret-Bennis, L., and Enjalbert, F. (2006). Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. *Reproduction Nutrition Development*, 46, 713-724.

- Troegeler-Meynadier, A., Nicot, M. C., Bayourthe, C., Moncoulon, R., and Enjalbert, F. (2003). Effects of pH and concentrations of linoleic and linolenic acids on extent and intermediates of ruminal biohydrogenation *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 86, 4054-4063.
- Vahmani, P., Fredeen, A. H., and Glover, K. E. (2013). Effect of supplementation with fish oil or microalgae on fatty acid composition of milk from cows managed in confinement or pasture systems. *Journal of Dairy Science*, 96, 6660-6670.
- Van Kessel, J. A. S., and Russell, J. B. (1996). The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiology Ecology*, 20, 205-210.
- Van Nevel, C. J., and Demeyer, D. I. (1996). Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents *in vitro*. *Reproduction Nutrition Development*, 36, 53-63.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., and Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.
- Wallace, R. J., McKain, N., McEwan, N. R., Miyagawa, E., Chaudhary, L. C., King, T. P., Walker, N. D., Apajalahti, J. H. A., and Newbold, C. J. (2003). *Eubacterium pyruvativorans* sp. nov., a novel non-saccharolytic anaerobe from the rumen that ferments pyruvate and amino acids, forms caproate and utilizes acetate and propionate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 965-970.
- Wanapat, M., Gunun, P., Anantasook, N., and Kang, S. (2014). Changes of rumen pH, fermentation and microbial population as influenced by different ratios of roughage (rice straw) to concentrate in dairy steers. *Journal of Agricultural Science*, 152, 675-685.
- Wang, J., and Song, M. (2001). Effect of sources and levels of carbohydrates on fermentation characteristics and hydrogenation of linoleic acid by rumen bacteria *in vitro*. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 14, 48-53.
- Wang, J., and Song, M. (2003). pH affects the *in vitro* formation of cis-9, trans-11 CLA and trans-11 octadecenoic acid by ruminal bacteria when incubated with oilseeds. *Asian Australasian Journal of Animal Science*, 16, 1743-1748.
- Zened, A., Enjalbert, F., Nicot, M. C., and Troegeler-Meynadier, A. (2013). Starch plus sunflower oil addition to the diet of dry dairy cows results in a trans-11 to trans-10 shift of biohydrogenation. *Journal of Dairy Science*, 96, 451-459.

4.3 EFECTO DE LA ADICION DE ACEITES DE OLIVA, GIRASOL O LINAZA A LA RACIÓN SOBRE EL PATRÓN DE FERMENTACIÓN, LA PRODUCCIÓN DE METANO Y LA BIOHIDROGENACIÓN RUMINAL

4.3.1 INTRODUCCIÓN

La utilización de grasas en los piensos para la alimentación de los rumiantes ha sido ampliamente estudiada desde hace decenios ([Johnson y col., 1956](#)). La adición de las grasas a los piensos de los rumiantes ha tenido dos propósitos fundamentales: aumentar la concentración energética de la ración para cubrir la demanda energética de los animales de alta producción y elevar el contenido de la materia grasa en la leche ([Palmquist y Jenkins, 1980](#)). Más recientemente, se ha planteado la posibilidad de utilizar grasas en los piensos de los rumiantes para aumentar la concentración de algunos nutrientes funcionales (ácido linoleico conjugado, C18:2 c9t11) en la carne y la leche ([Chilliard y col., 2000](#)), haciendo que estos alimentos puedan tener efectos beneficiosos sobre la salud del consumidor ([Harris, 2008](#)). Además, las grasas podrían reducir las emisiones del metano que se produce durante la fermentación ruminal ([Beauchemin y col., 2007](#)) y, de este modo, contribuir a la sostenibilidad ambiental de los sistemas de producción de rumiantes. Los ácidos grasos poliinsaturados de 18 C (tales como los contenidos en los aceites de girasol o de linaza) son algunos de los lípidos con potencial tanto para reducir la producción de metano ([Martin y col., 2008](#)) como para aumentar la formación de C18:2 c9t11 y de ácido vaccénico (C18:1 t11) en el rumen ([AbuGhazaleh y Jacobson, 2007](#); [Luna y col., 2008](#)).

Por otra parte, la utilización de grasas en la alimentación de los rumiantes ha sido objeto de numerosos estudios debido a que este tipo de ingredientes puede provocar algunos efectos adversos sobre la fermentación ruminal. Dichos efectos desfavorables dependen de diversos factores, entre los que podría destacarse las características de la grasa (longitud de cadena y grado de insaturación de los ácidos grasos, presencia de ácidos grasos no esterificados o grado de esterificación de los triglicéridos) ([Chalupa y col., 1984](#)), el nivel de inclusión de grasa ([Dewhurst y col., 2006](#)) o la composición del pienso al que se añade la grasa (proporciones de forraje y concentrado) ([Doreau y Ferlay, 1994](#)).

Por este motivo, cuando se investigan los posibles efectos favorables de la adición de grasas a los piensos de los rumiantes (aumento de C18:2 c9t11 en la leche o en la carne, reducción de la formación de metano), es preciso evaluar también los efectos colaterales sobre la digestibilidad del alimento, los procesos de fermentación y la población microbiana en el rumen. La técnica de simulación de la fermentación ruminal (RUSITEC), en la que se utilizan fermentadores de flujo semicontinuo, es un procedimiento experimental que permite un control preciso de las condiciones y factores que afectan la fermentación y la recuperación cuantitativa de sus productos finales durante un periodo relativamente largo ([Czerkawski y Breckenridge, 1977](#); [Czerkawski y Breckenridge, 1979](#)).

El objetivo de este estudio fue investigar los efectos de la adición de diferentes aceites vegetales al pienso sobre el patrón de fermentación ruminal, la producción de metano y la biohidrogenación de los ácidos grasos en fermentadores RUSITEC.

4.3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Tal y cómo se describió en el capítulo 3, el estudio se llevó a cabo utilizando 16 vasijas de fermentación (de 650 mL de volumen útil) diseñadas según el sistema de simulación ruminal RUSITEC ([Czerkawski y Breckenridge, 1977](#)). Se utilizó como inóculo el contenido ruminal de ovejas de raza merina, que recibían una dieta a base de un heno de hierba (70 %) y un alimento concentrado (30 %).

En el primer día del experimento, se inició el periodo de adaptación tras la inoculación de cada vasija con 400 mL de líquido ruminal filtrado y diluido en 250 mL de saliva artificial y con 80 g de un residuo de digesta ruminal obtenido tras haber extraído el líquido.

4.3.2.1 Tratamientos experimentales

El diseño del experimento consistió en cuatro tratamientos diferenciados entre sí por el tipo de aceite que se añadió al pienso utilizado como sustrato de fermentación. En el tratamiento control la dieta consistió en un pienso integral o ración completa para ovejas en lactación que no contenía ninguna grasa como ingrediente. Los otros tres tratamientos fueron el mismo pienso utilizado en el

tratamiento control al que se añadió un aceite de origen vegetal para alcanzar una concentración del 6 % de la materia seca. Se utilizaron tres tipos de aceite, uno para cada uno de los tratamientos: aceite de oliva, aceite de girasol o aceite de linaza. Los ingredientes y la composición química de los piensos resultantes se presentan en la Tabla 11. Los piensos fueron preparados y mezclados cada tres días y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Tabla 11. Ingredientes y composición química de las dietas experimentales

<i>Ítem</i>	Dietas experimentales			
	Control	Oliva	Girasol	Linaza
Ingredientes de la dieta, % de MS				
Maíz	25,0	23,8	23,8	23,8
Cebada	15,0	14,3	14,3	14,3
Torta de soja	20,0	19,0	19,0	19,0
Heno de alfalfa	20,0	19,0	19,0	19,0
Pulpa de remolacha	9,0	8,6	8,6	8,6
Melaza de remolacha	6,0	5,7	5,7	5,7
Bicarbonato sódico	1,5	1,4	1,4	1,4
Corrector vitamínico mineral	3,5	3,3	3,3	3,3
Aceite de oliva	-	6,0	-	-
Aceite de girasol	-	-	6,0	-
Aceite de linaza	-	-	-	6,0
Composición química, % de MS				
Materia orgánica	92,5	92,7	93,0	92,9
Proteína bruta	15,3	14,5	14,5	14,7
Fibra neutro detergente	23,1	22,0	22,2	21,9
Fibra ácido detergente	11,5	10,9	11,0	10,8
Extracto etéreo	2,2	7,0	7,3	7,1
Ácidos grasos (AG) en el pienso, % del total de AG				
C14:0	0,10	-	0,02	-
C16:0	22,1	15,3	12,3	11,1
Total de AG C18	76,9	82,1	85,2	87,4
Perfil de C18 en la dieta, % del total de C18				
C18:0	5,1	5,1	5,7	5,1
C18:1 c9	35,1	71,0	38,7	25,3
C18:2 c9c12	52,8	20,7	53,2	30,1
C18:3 c9c12c15	7,0	3,3	2,2	39,5

Composición de los aceites (% del total de metil ésteres de ácidos grasos):

Aceite de oliva:

12,7 % C16:0, 4,2 % C18:0, 71,2 % C18:1 c9, 7,0 % C18:2 c9c12 y 1,6 % C18:3 c9c12c15

Aceite de girasol:

8,5 % C16:0, 4,9 % C18:0, 35,4 % C18:1 c9, 47,8 % C18:2 c9c12 y 0,3 % C18:3 c9c12c15

Aceite de linaza:

6,9 % C16:0, 4,6 % C18:0, 19,7 % C18:1 c9, 19,6 % C18:2 c9c12 y 47,5 % C18:3 c9c12c15

4.3.2.2 Recogida y análisis de muestras

Tras el periodo de adaptación se procedió al registro de mediciones y la recogida de muestras (producción total de gas y CH₄, volumen de líquido efluente y concentración en el mismo de ácidos grasos volátiles (AGV), L-lactato y

amoníaco) durante un periodo de 14 días. También se determinó la desaparición de sustrato tras 48 h de incubación y la síntesis de proteína microbiana (utilizando ^{15}N como marcador). El último día del experimento se recogieron y prepararon muestras para el análisis de ácidos grasos de cadena larga, que fueron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente liofilizadas. Los ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía de gases tras la extracción de la grasa y la metilación de los ácidos grasos. Los procedimientos para el registro de datos, la recogida de muestras y los análisis de laboratorio han sido descritos en detalle en el capítulo 3.

4.3.2.3 Evaluación de los efectos sobre la actividad fermentativa

Una vez finalizado el experimento, el contenido líquido de las vasijas de fermentación fue utilizado para evaluar la actividad fermentativa sobre diversos sustratos como consecuencia de los posibles cambios adaptativos de la población microbiana a los tratamientos experimentales, según lo propuesto por [Carro y Miller \(1999\)](#). El líquido recuperado en cada vasija sirvió como inóculo y medio de cultivo para realizar incubaciones en cultivos no renovados de microorganismos ruminales (seriados o “discontinuos”), donde se midió la respuesta en la cinética de fermentación a partir de la curva de producción de gas. Para evaluar la actividad de fermentación del líquido contenido en cada vasija, se utilizaron tres sustratos para realizar las incubaciones: celulosa, almidón y la misma ración utilizada en el tratamiento de control (pienso control sin grasa añadida). Estos sustratos fueron molidos a través de una malla de 1 mm.

Una vez finalizado el experimento en los fermentadores de simulación ruminal, se extrajeron las bolsas con residuos de incubación y se lavaron con saliva artificial. Tras el lavado, la saliva se añadió al líquido contenido en la vasija (aproximadamente unos 600 mL). De dicho líquido, se dosificaron 50 mL en botellas de suero de 120 mL que contenían 500 mg de uno de los sustratos mencionados anteriormente. Este proceso se realizó bajo un flujo continuo de CO_2 para limitar la exposición al aire, y manteniendo el líquido a una temperatura aproximada de $39\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se mantuvo el flujo de CO_2 en el espacio de cabeza de las botellas para retirar el O_2 (condiciones de anaerobiosis) y posteriormente las botellas fueron cerradas con tapones de goma y selladas con cápsulas de aluminio. Se agitaron vigorosamente para mezclar el sustrato y el inóculo y se

introdujeron inmediatamente en una incubadora a 39 °C. La producción de gas acumulada en el espacio de cabeza se midió tras 2, 4, 6, 8, 12, 22, 32, 46, 72, 96 y 120 h de incubación utilizando un transductor de presión según la técnica descrita por [Theodorou y col. \(1994\)](#).

4.3.2.4 Análisis de la composición química

Los piensos experimentales y los residuos de incubación se analizaron para determinar su contenido en materia seca (método AOAC 934.01), cenizas (método AOAC 942.05) y N (método AOAC 984.13) de acuerdo con la [AOAC \(1999\)](#). Las determinaciones de FND (método AOAC 2002.04) y FAD (método AOAC 973.18) se llevaron a cabo de acuerdo con el método de [Van Soest y col. \(1991\)](#), utilizando un analizador de fibra ANKOM220 (ANKOM Technology Corporation, NY, EE.UU.). El extracto etéreo fue determinado por tecnología de filtro de mangas ([AOCS, 2008; Procedimiento Am 5-04](#)).

4.3.2.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el procedimiento GLM de [SAS \(2002\)](#) para un diseño completamente aleatorio a una vía con cuatro réplicas por tratamiento ([Steel y Torrie, 1981](#)). Los cuatro tratamientos experimentales se asignaron al azar a las vasijas de fermentación (16), de forma que para cada tratamiento se dispuso de cuatro vasijas. Cada vasija fue considerada una unidad experimental independiente, dando como resultado las cuatro réplicas por tratamiento.

El modelo estadístico fue $y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$, donde y_{ij} representa el valor para cada observación individual correspondiente al tratamiento i en la vasija j , μ es la media general; T_i es el efecto del tratamiento debido al aceite añadido al pienso ($i = 1 \dots 4$, control, oliva, girasol o linaza) y ε_{ij} es el término error residual que corresponde al efecto aleatorio de la variabilidad entre réplicas dentro de cada tratamiento. Se consideró que un efecto fue estadísticamente significativo si $P < 0,05$ y que había una tendencia cuando $P < 0,10$. Se realizó una comparación múltiple entre los valores medios de los cuatro tratamientos utilizando la prueba de Tukey. Además, se realizó un contraste *a priori* para comprobar el efecto de la adición de aceite, en el que se comparó el tratamiento control (sin aceite añadido) frente a la media de los tres tratamientos en los que se añadió aceite al pienso.

Para el análisis de las cinéticas de fermentación en los cultivos no renovados de microorganismos ruminales, las curvas de producción de gas se ajustaron al modelo exponencial $G = A \left[1 - e^{-c(t-L)} \right]$ ([France y col., 2000](#)), donde G (mL/g MS incubada) es la producción de gas acumulada en el tiempo de incubación t (h), A (mL/g MS incubada) es la producción asintótica de gas, c (h^{-1}) es el ritmo fraccional de fermentación del sustrato y L (h) es el tiempo de retraso. El ritmo medio de fermentación del sustrato (mL/h) se calculó como $\frac{Ac}{2 [\ln(2) + cL]}$. Para analizar el efecto del tipo de aceite añadido sobre la cinética de fermentación de cada sustrato (almidón, celulosa o pienso), los parámetros descritos anteriormente se evaluaron mediante análisis de la varianza, utilizando un diseño de parcelas divididas en el que se consideró la vasija dentro del tratamiento como el término de error ([Steel y Torrie, 1981](#)).

4.3.3 RESULTADOS

En la Tabla 12 se muestra el efecto de la adición de aceite sobre el pH del medio de cultivo en los fermentadores y los coeficientes de desaparición de la MS, MO, FND, FAD, proteína bruta (PB) y extracto etéreo. No hubo diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$) en el pH en los fermentadores. Se observaron diferencias significativas entre tratamientos respecto a los coeficientes de desaparición de la MO, la FND y la PB, de forma que la degradación de sustrato fue mayor cuando se añadió aceite de linaza que al añadir aceite de girasol. Los valores para los tratamientos control y oliva fueron intermedios entre los dos anteriores. La desaparición de EE fue menor en el tratamiento control que en los tratamientos en los que se añadió aceite ($P < 0,001$), y dentro de estos el mayor valor se observó cuando se añadió aceite de linaza. En relación con la producción total de gas no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. La adición de los tres aceites causó una disminución significativa ($P < 0,01$) de la concentración de metano en el gas de fermentación y de la producción de metano (expresada por g de materia orgánica fermentable).

No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en la producción total de AGV; pero la adición de aceite si provocó algunos cambios en el patrón de fermentación. En comparación con el tratamiento control, la producción de butirato fue menor en los tres tratamientos con aceite. La producción de propionato y de isoácidos fue mayor cuando se añadió aceite de linaza al pienso que en el grupo control. La ratio acetato:propionato fue significativamente mayor en el control que en los tratamientos con adición de aceites al pienso; pero no se encontraron diferencias entre los tratamientos con aceite. No se observaron diferencias significativas en la producción diaria de lactato.

Tabla 12. Efecto de la adición de aceites de origen vegetal al pienso sobre la fermentación ruminal

Ítem	Dietas experimentales ¹				DER ²	Efecto tratamiento	Contraste ³
	Control	Oliva	Girasol	Linaza		P =	P =
Volumen de efluente, mL/d	577	565	513	569	20,3	0,164	0,255
pH	6,73	6,72	6,66	6,67	0,023	0,126	0,126
Coeficientes de desaparición, g/100 g incubados							
Materia orgánica (sin grasa)	67,4 ^{ab}	70,8 ^{ab}	66,1 ^b	72,1 ^a	2,54	0,022	0,172
Fibra neutro detergente	32,9 ^{ab}	34,7 ^a	29,0 ^b	35,4 ^a	2,61	0,044	0,961
Fibra ácido detergente	23,4	24,3	19,7	26,9	3,16	0,082	0,879
Proteína bruta	49,5 ^{ab}	54,9 ^a	47,6 ^b	54,7 ^a	3,66	0,036	0,197
Extracto etéreo	51,8 ^c	70,5 ^b	73,8 ^b	80,9 ^a	2,86	<0,001	<0,001
Producción de gas							
Total, L/d	3,01	2,75	2,81	2,98	0,131	0,470	<0,001
CH ₄ , %	7,04 ^a	5,79 ^b	5,66 ^b	5,57 ^b	0,216	0,002	<0,001
CH ₄ , mmol/g MOF ⁴	1,02 ^a	0,81 ^b	0,78 ^b	0,73 ^b	0,090	0,005	<0,001
AGV, mmol/d							
Acetato	24,9	23,8	22,0	24,1	0,910	0,206	0,160
Propionato	8,39 ^b	10,30 ^{ab}	9,87 ^{ab}	11,88 ^a	0,684	0,003	0,002
Butirato	7,38 ^a	5,64 ^b	5,50 ^b	5,51 ^b	0,332	0,005	<0,001
Isoácidos	2,03 ^b	2,20 ^{ab}	2,13 ^{ab}	2,52 ^a	0,110	0,045	0,070
Total de AGV	51,2	48,5	46,2	50,7	1,430	0,109	0,125
Ratio acetato : propionato	2,99 ^a	2,32 ^b	2,27 ^b	2,03 ^b	0,092	<0,001	<0,001
L-lactato, mg/d	5,56	6,67	7,27	6,48	0,708	0,431	0,156
Metabolismo nitrogenado							
Amoniaco, mg/d	89,1 ^a	72,4 ^b	65,0 ^b	65,0 ^b	3,17	0,001	<0,001
Proteína microbiana, g/d	1,06	1,02	0,90	1,14	0,091	0,353	0,714
Proteína microbiana, g/100g MOF ⁴	11,4	9,2	9,6	11,2	1,43	0,158	0,127

¹ Control = sin grasa añadida; Oliva = adición de aceite de oliva; Girasol = adición de aceite de girasol;

Linaza = adición de aceite de linaza. Todos los aceites se añadieron a un nivel de inclusión del 6 % de la MS

² DER = desviación estándar residual

³ Comparación entre el tratamiento control y otros tratamientos (adición de aceites)

⁴ MOF = Materia orgánica fermentable

^{a,b,c} Dentro de una misma línea, las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos ($P < 0,05$, prueba de Tukey)

Tabla 13. Efecto de la fuente de inóculo sobre la cinética de fermentación de tres substratos

Ítem	Dietas experimentales ¹				DER ²	Efecto tratamiento	Contraste ³
	Control	Oliva	Girasol	Linaza		P =	P =
Pienso del tratamiento control							
Producción asintótica de gas, mL	311 ^a	291 ^{ab}	287 ^{ab}	277 ^b	22,0	0,053	0,014
Ritmo de producción gas, h ⁻¹	0,044	0,046	0,045	0,042	0,0004	0,425	0,759
Tiempo de retraso, h	2,7	2,5	2,6	2,5	0,29	0,287	0,129
Producción de gas a 24 h, mL	189 ^a	184 ^{ab}	176 ^{ab}	165 ^b	12,7	0,017	0,023
Ritmo medio de fermentación, mL/h	8,40 ^a	8,36 ^{ab}	7,90 ^{ab}	7,33 ^b	0,701	0,037	0,091
Almidón							
Producción asintótica de gas, mL	311	310	301	306	35,1	0,947	0,742
Ritmo de producción gas, h ⁻¹	0,059 ^a	0,043 ^b	0,039 ^b	0,039 ^b	0,0073	0,001	<0,001
Tiempo de retraso, h	4,6 ^a	2,1 ^b	2,2 ^b	2,4 ^b	0,88	<0,001	<0,001
Producción de gas a 24 h, mL	210 ^a	191 ^b	171 ^c	172 ^c	12,1	<0,001	<0,001
Ritmo medio de fermentación, mL/h	9,44 ^a	8,62 ^{ab}	7,48 ^{ab}	7,50 ^b	0,701	0,037	0,091
Celulosa							
Producción asintótica de gas, mL	352 ^a	300 ^{ab}	278 ^b	271 ^b	38,1	0,005	0,001
Ritmo de producción gas, h ⁻¹	0,018	0,017	0,016	0,014	0,0034	0,192	0,111
Tiempo de retraso, h	9,8	13,7	16,7	15,2	5,27	0,112	0,030
Producción de gas a 24 h, mL	108 ^a	68 ^b	52 ^b	49 ^b	15,9	<0,001	<0,001
Ritmo medio de fermentación, mL/h	3,69 ^a	2,70 ^b	2,34 ^b	2,11 ^b	0,391	<0,001	<0,001

¹ Inóculo obtenido de las vasijas de fermentación del RUSITEC correspondientes a los tratamientos:

Control = sin grasa añadida; Oliva = adición de aceite de oliva; Girasol = adición de aceite de girasol;

Linaza = adición de aceite de linaza.

² DER = desviación estándar residual

³ Comparación entre el tratamiento control y otros tratamientos (adición de aceites)

^{a,b,c} Dentro de una misma línea, las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos ($P < 0,05$, prueba de Tukey)

Se observó una mayor producción de amoníaco en el tratamiento control que en los tratamientos con aceite ($P < 0,01$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre tratamientos ni en la síntesis diaria ni en la eficiencia (g/100g de MOF) de síntesis de proteína microbiana.

En la prueba para la evaluación de la actividad fermentativa en el contenido de las vasijas mediante la técnica de las curvas de producción de gas (Tabla 13), se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos. Cuando se utilizó la dieta control como sustrato de fermentación solo se encontraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento linaza en el volumen de producción de gas a las 24 h de incubación y en el ritmo medio de fermentación, que fueron mayores en el grupo control. Al incubar almidón, el ritmo fraccional de fermentación y la producción de gas a las 24 h fueron mayores en el grupo control que en los otros tratamientos experimentales. El tiempo de retraso fue mayor en el control que en los tratamientos con aceite y no se observaron diferencias entre tratamientos para la producción asintótica de gas. Cuando el sustrato de fermentación fue la celulosa, todos los aceites disminuyeron la producción de gas a las 24 h y el ritmo medio de fermentación y se aumentó el tiempo de retraso.

En cuanto a la composición de ácidos grasos de la digesta (Tabla 14), mientras que la adición de cualquiera de los tres aceites determinó una menor proporción de C14:0, solo la adición de aceite de oliva provocó ($P < 0,05$) una disminución en la proporción de C16:0 en comparación con el control. Sin embargo, el test de contraste mostró que, en comparación con el control, la adición de aceite estaba asociada con una reducción en las proporciones de C14:0 y C16:0 ($P < 0,05$) en el total de AG de la digesta. A pesar de la diferente composición en ácidos grasos de los piensos incubados, no hubo diferencias entre los tratamientos experimentales en la proporción del total de ácidos grasos de 18 C entre los tratamientos.

Tabla 14. Efecto de la adición de aceites de origen vegetal sobre el perfil y la biohidrogenación de ácidos grasos en la digesta ruminal

Ítem	Dietas experimentales ¹				DER ²	Efecto tratamiento	Contraste ³
	Control	Oliva	Girasol	Linaza		P =	P =
Ácidos grasos, % del total de AG							
C14:0	1,90 ^a	0,57 ^b	0,90 ^b	0,92 ^b	0,361	0,006	0,001
C16:0	23,7 ^a	18,6 ^b	21,0 ^{ab}	20,9 ^{ab}	1,85	0,041	0,020
Total de ácidos grasos C18	79,8	83,7	81,7	81,7	3,28	0,509	0,248
Perfil de AG C18, % of total de AG C18							
C18:0	18,9 ^a	13,1 ^b	16,4 ^{ab}	15,5 ^{ab}	1,94	0,011	0,006
C18:1 t11	10,3 ^a	4,4 ^b	5,7 ^{ab}	4,2 ^b	2,25	0,034	0,007
C18:1 t12	1,44 ^b	5,88 ^a	1,77 ^b	0,89 ^b	0,659	<0,001	0,032
C18:1 c9	15,4 ^c	57,7 ^a	36,7 ^b	31,3 ^b	4,46	<0,001	<0,001
C18:1 c11	12,30 ^a	5,49 ^b	5,73 ^b	5,10 ^b	1,916	0,008	0,001
C18:2 c9c12	21,7 ^a	9,5 ^b	24,4 ^a	20,8 ^a	4,16	0,003	0,319
C18:3 c9c12c15	1,82 ^b	0,61 ^c	0,64 ^c	12,21 ^a	0,303	<0,001	<0,001
Otros	9,47 ^a	3,35 ^b	4,93 ^b	4,27 ^b	0,551	0,009	0,001
Biohidrogenación aparente							
C18:3 c9c12c15	71,4	81,5	70,3	73,4	5,71	0,119	0,374
C18:2 c9c12	58,9 ^a	54,1 ^a	54,1 ^a	30,9 ^b	9,53	0,008	0,044
C18:1 c9	49,9 ^a	18,7 ^b	2,1 ^b	-23,5 ^c	10,00	<0,001	<0,001
Total de C18 insaturados	54,3 ^a	27,1 ^b	34,3 ^b	35,6 ^{ab}	6,76	0,007	0,002

¹ Control = sin grasa añadida; Oliva = adición de aceite de oliva; Girasol = adición de aceite de girasol;

Linaza = adición de aceite de linaza. Todos los aceites se añadieron a un nivel de inclusión del 6 % de la MS

² DER = desviación estándar residual

³ Comparación entre el tratamiento control y otros tratamientos (adición de aceites)

^{a,b,c} Dentro de una misma línea, las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos ($P < 0,05$, prueba de Tukey)

El perfil de ácidos grasos de 18 C en la digesta reflejó, en cierta medida, la composición de los ácidos grasos del aceite añadido en cada tratamiento experimental. La concentración de ácido oleico (C18:1 c9) fue mayor en la digesta de los fermentadores en los que se añadió aceite de oliva (58 %, $P < 0,05$) y menor en el grupo control (15 %), mientras que en los tratamientos girasol y linaza los valores fueron intermedios. De la misma forma, la concentración de ácido linolénico (C18:3 c9c12c15) fue significativamente superior ($P < 0,05$) en el tratamiento linaza que en los otros tratamientos. No hubo diferencias entre los tratamientos control (24 %), girasol (21 %) y linaza (22 %) en la proporción de ácido linoleico (C18:2 c9c12), pero la proporción de este AG fue significativamente ($P < 0,05$) menor cuando se añadió aceite de oliva al pienso (10 %).

Mediante el test de contraste se observaron diferencias significativas entre el control y el conjunto de tratamientos con aceite para todos los ácidos grasos evaluados, excepto C18:2 c9c12. Sin embargo, la comparación entre tratamientos mostró que la proporción de C18:0 fue mayor en el control que con la adición de aceite de oliva, y la proporción de C18:1 t11 fue mayor en el control que con la

suplementación con aceites de oliva o de linaza. El control también resultó en una mayor proporción de C18:1 *c*11 que todos los otros tratamientos. La menor proporción de C18:0 se observó con la suplementación con aceite de oliva que, sin embargo, provocó un aumento en la proporción de C18:1 *t*12 (5,9 %, $P < 0,05$).

El test de contraste evidenció diferencias entre el control y el conjunto de tratamientos con adición de aceite ($P < 0,05$) para la biohidrogenación aparente del total de AG de 18 C insaturados y de los ácidos grasos C18:1 *c*9 y C18:2 *c*9*c*12. A partir de la comparación múltiple entre medias se observó que la biohidrogenación del total de AG de 18 C insaturados fue mayor en el control que en los tratamientos oliva y girasol, sin diferencias con respecto al grupo linaza. La adición de aceite de linaza disminuyó la biohidrogenación del ácido C18:2 *c*9*c*12 ($P < 0,05$) en comparación con los otros tratamientos. La adición de aceites de oliva o de girasol redujo la biohidrogenación del ácido C18:1 *c*9, en comparación con el control. Sin embargo, al añadir aceite de linaza la proporción de este ácido graso se incrementó, en lugar de disminuir por hidrogenación. Esto hizo que para este ácido se estimase un coeficiente de biohidrogenación negativo. Con respecto a la biohidrogenación aparente de C18:3 *c*9*c*12*c*15, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

4.3.4 DISCUSIÓN

4.3.4.1 Digestión del sustrato, patrón de fermentación y síntesis microbiana en el rumen

En relación con el tratamiento control la adición de los aceites no afectó a la desaparición de sustrato de las bolsas de fibra sintética. En los fermentadores RUSITEC se considera que dicha desaparición representa la degradación de sustrato por los procesos de digestión y fermentación microbianas.

La adición de lípidos puede inhibir la digestión de fibra en el rumen ([Jenkins, 1993](#)) por mecanismos de acción que incluyen la formación de una capa física sobre la fibra que impide la adhesión y colonización de los microorganismos, una modificación de la población microbiana del rumen por la posible toxicidad de la grasa sobre ciertos microorganismos ([Palmquist y col., 1986](#)) y la inhibición de la actividad microbiana por el efecto de los ácidos grasos a nivel de las paredes y membranas celulares de los microorganismos ([Palmquist y Jenkins, 1980](#)). En condiciones *in vitro*, los efectos inhibidores de la fermentación de sustrato son más notorios cuando se usan dietas purificadas (50 % de celulosa), incluso por la adición de sólo un 1 % de aceite ([Brooks y col., 1954](#)). Sin embargo, se ha observado que una extensa área de superficie del sustrato de fermentación puede dispersar las grasas y permitir la colonización de bacterias y la digestión de la fibra ([Firkins y col., 1991](#)). Por otra parte, el efecto inhibidor de la fermentación también depende del nivel de adición de la grasa ([Jenkins, 1987](#)) y de la composición de la dieta. [Ueda y col. \(2003\)](#) observaron que la adición de grasa puede disminuir la digestibilidad ruminal de la fibra sólo si la dieta tiene una alta proporción de concentrado. En experimentos con vacas lecheras ([Palmquist, 1995](#)), no se observó un efecto significativo sobre la digestibilidad *in situ* de la FAD al suplementar la ración con 500 g de grasa de origen animal, vegetal, jabones de calcio, ácidos grasos de sebo o de semillas oleaginosas (algodón, girasol, soja).

La desaparición del EE aumentó como consecuencia de la adición de los tres aceites. Este resultado puede indicar que el EE de la dieta control tiene una menor solubilidad que el de las dietas con aceite. [Lough y Smith \(1976\)](#) observaron que dentro de un rango de pH ruminal entre 2,0 y 7,4, la solubilidad de

los AG de cadena larga en disoluciones acuosas que contienen sales biliares fue: C18:2 c9c12 > C18:1 c9 > C18:1 t9 > C16:0 > C18:0. La adición de aceite de linaza estuvo asociada con una mayor desaparición del EE. Sin embargo, dado que no se observaron diferencias entre tratamientos en la producción total de AGV, es posible que el aceite adicionado pudiera haber alterado el flujo de las partículas de alimento hacia el exterior de la bolsa, pero sin afectar la fermentación efectiva. De hecho, al tratarse de aceites líquidos, su salida de la bolsa pudo haberse producido sin necesidad de haber sido degradados o hidrolizados, lo cual también explicaría la mayor desaparición de EE observada en los tres tratamientos en los que el alimento se suplementó con un aceite vegetal.

El aceite de linaza disminuyó la capacidad del inóculo para fermentar la dieta control, mientras que los aceites de oliva y girasol tuvieron un comportamiento intermedio entre éste y el tratamiento control.

No obstante, los resultados de la prueba de cinética de fermentación *in vitro* confirmaron que los efectos adversos de los lípidos sobre la fermentación ruminal son más evidentes cuando se fermentan sustratos purificados ([Brooks y col., 1954](#); [Palmquist y Conrad, 1980](#)), en nuestro caso sobre almidón o celulosa, como representativos de los hidratos de carbono no estructurales o estructurales, respectivamente. El efecto depresor de la fermentación fue mayor cuando se incubó la celulosa como sustrato, lo que confirma que la adición de grasa afecta, fundamentalmente, a la digestión ruminal de los carbohidratos estructurales ([Jenkins, 1993](#)). Además, estos resultados están en consonancia con la premisa de que cuanto mayor es el grado de insaturación de los ácidos grasos, mayor es su efecto tóxico sobre las bacterias ruminales ([Palmquist y Jenkins, 1980](#); [Maia y col., 2007](#)). En esta prueba no se añadió aceite a los cultivos seriados en los que se realizaron las incubaciones, por lo que los resultados observados no se deben a un efecto directo del aceite sobre la fermentación, sino a los cambios en la microbiota producidos en las vasijas RUSITEC en respuesta a la adición de dichos aceites.

La adición de grasa no alteró la producción total de AGV ni la producción de acetato; sin embargo, sí aumentó la proporción de propionato y disminuyó la de butirato. En general, la producción de ácidos grasos volátiles se ve menos afectada por la adición de triglicéridos que por la de ácidos grasos libres ([Chalupa](#)

[y col., 1984](#)). En condiciones *in vitro* la adición de hasta un 25 % de triglicéridos a una dieta completa no provocó ningún efecto sobre la producción total de AGV ni sobre la digestibilidad del alimento, a pesar de que ambos parámetros disminuyeron significativamente con la adición de jabones de potasio que son rápidamente disociados en el rumen ([Getachew y col. \(2001\)](#)). Usando el sistema RUSITEC, no hubo efectos significativos sobre la producción total de AGV en respuesta a la adición de lípidos (5 % de la MS) a dietas con altas proporciones de alimentos concentrados ([Jalc y col., 2006b](#)), o a dietas con un 60 % de alfalfa y un 40 % de maíz o con un 80 % de alfalfa y un 20 % de cebada ([Jalc y col., 2007](#)). En un experimento con ovejas se han observado resultados similares; la adición de aceite de girasol y aceite de pescado (20 y 10 g/kg de materia fresca, respectivamente) a dietas con una alta proporción de concentrado no modificó las concentraciones de AGV, amoníaco o lactato en el rumen ([Toral y col., 2009](#)). De igual forma [Doreau y col. \(2009\)](#) no apreciaron ningún efecto negativo de una suplementación moderada de linaza sobre la función ruminal.

Con los lípidos en forma de jabones insolubles se disminuye ostensiblemente el posible efecto negativo de las grasas sobre la fermentación microbiana ([Palmquist y col., 1986](#)). En el rumen no hay una formación significativa de estos jabones, y se ha observado que el impacto perjudicial de las grasas sobre de fermentación ruminal puede ser atenuado por la presencia de metales alcalinos ([Galbraith y Miller, 1973](#)) o contrarrestado por la adición de ceniza de alfalfa (4,1 %) o CaCO_3 (0,6 %) ([Brooks y col., 1954](#)). Este efecto ha sido atribuido a la capacidad de amortiguación del pH o la capacidad de emulsionar las grasas de algunos metales, con lo que se evita, al menos parcialmente, que se forme la capa sobre la fibra de celulosa.

En línea con los resultados del presente trabajo, se ha observado que la adición de grasa a la dieta reduce la ratio acetato:propionato. [Chalupa y col. \(1984\)](#) apreciaron este efecto con la adición de triglicéridos (10 %) y ácidos grasos libres. También se ha observado un efecto similar con la adición de sebo, grasa amarilla y aceite de maíz (5 % a 25 %) ([Getachew y col., 2001](#)), aceite de maíz (2 % al 10 %) ([Jenkins, 1987](#)), una mezcla de aceite de girasol y aceite de pescado ([Toral y col., 2009](#)), un aceite de linaza o con semillas de colza ([Jalc y col., 2006a](#)). La reducción en la ratio acetato:propionato parece ser la

consecuencia de la disminución en la proporción molar de acetato y el incremento en la de propionato ([Chalupa y col., 1984](#); [Getachew y col., 2001](#)). No obstante, también puede observarse cuando cambia la proporción molar de uno solo de estos AGV ([Jenkins, 1987](#); [Toral y col., 2009](#)).

La reducción de la producción de butirato en respuesta a la adición de grasas a la dieta también ha sido observada en numerosos estudios ([Sutton y col., 1983](#); [Chalupa y col., 1984](#); [Jenkins, 1987](#); [Machmüller y col., 1998](#)). En otros estudios *in vitro* también se ha advertido una importante reducción en la proporción molar de butirato ([Broudiscou y Lassalas, 1991](#)). La reducción de la producción de butirato puede deberse a que algunas bacterias ruminales productoras de butirato, tales como *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Butyrivibrio hungatei* o *Eubacterium ruminantium*, no crecen en presencia de C18:2 c9c12 o C18:3 c9c12c15 (en concentraciones de 50 mg/mL). No obstante, algunas especies productoras de butirato, tales como *Butyrivibrio fibrisolvens*, un microorganismo con decenas de cepas identificadas, si pueden crecer en presencia de esos AG insaturados ([Maia y col., 2007](#)) y, además, tienen la capacidad para hidrogenar C18:2 c9c12 ([Fujimoto y col., 1993](#)).

Ninguno de los aceites afectó la síntesis de proteína microbiana (expresada en g/d o en g/100g de MOF), pero la adición de aceites si ocasionó una disminución en la concentración de amoníaco en las vasijas de fermentación. En fermentadores continuos se ha observado que la adición de C18:1 c9, C18:2 c9c12 o C18:3 c9c12c15 (3,3 % de la MS) no afectó a la síntesis microbiana ([Kolver y col., 2002](#)). En experimentos *in vivo* no se apreciaron diferencias en la síntesis de proteína microbiana al suplementar la ración con varias fuentes y niveles de grasa ([Oldick y Firkins, 2000](#); [Szumacher-Strabel y col., 2001](#)). La ausencia de efectos de la adición de lípidos sobre la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana también se demostró en un metaanálisis en el que se utilizaron datos de 95 experimentos ([Schmidely y col., 2008](#)). En relación con la concentración de amoníaco, [Doreau y Ferlay \(1995\)](#) señalaron que la suplementación de grasas no causa variaciones significativas en la concentración de amoníaco en el rumen, aunque en algunos casos se ha apreciado una disminución de la misma ([Machmüller y col., 1998](#); [Potkanski y col., 2001](#); [Jalc y col., 2007](#)). [Beauchemin y col. \(2007\)](#), en un experimento *in vivo*, observaron que

el único efecto importante de la alimentación con lípidos sobre la fermentación ruminal fue la reducción de amoníaco ruminal y no observaron diferencias entre distintas fuentes de lípidos. Es posible que el efecto de las grasas sobre la degradación ruminal de proteínas y aminoácidos dependa, en gran medida, del sustrato de fermentación ([Broudiscou y Lassalas, 1991](#)).

Entre los mecanismos sugeridos para explicar la reducción de la concentración de amoníaco está la supresión de los protozoos ciliados o la reducción de su actividad de depredación de las bacterias ([Kowalczyk y col., 1977](#); [Oldick y Firkins, 2000](#)) o una disminución de la desaminación de los aminoácidos causada por una modificación de la población de bacterias ([Broudiscou y Lassalas, 1991](#)). A pesar de que en el sistema de fermentación RUSITEC el número de protozoos disminuye hasta en un 96 % durante los primeros días, y sólo se mantienen relativamente constantes después de 6 días de incubación ([Carro y col., 1995](#)), la adición de aceite de coco al sustrato de fermentación produjo de manera simultánea una notoria disminución de los protozoarios y una reducción en la concentración de amoníaco en el medio de cultivo ([Machmüller y col., 1998](#)). En otros estudios se ha observado que la adición de grasa redujo la producción de metano pero no la de N amoniacal ([Abel y col., 2006](#)), o que pueden disminuir ambos productos finales de la fermentación ([Jalc y col., 2007](#)). Adicionalmente, los ácidos grasos de 18 C pueden afectar al crecimiento de las bacterias, pero no repercuten en todas las especies de la misma manera ([Maia y col., 2007](#); [Zhang y col., 2008](#)). Así puede ocurrir que simultáneamente la síntesis de proteína microbiana tienda por un lado a disminuir debido a los efectos tóxicos de los aceites y, por otro lado, a aumentar debido a la reducción en la población de protozoarios, aunque la ausencia de protozoos del rumen reduce la diversidad de la población bacteriana ([Yáñez-Ruiz y col., 2007](#)).

4.3.4.2 Producción de gas de fermentación y metano

La adición de los tres aceites (oliva, girasol y linaza) disminuyó la concentración de metano en el gas de fermentación y la producción de metano (expresada como mmol/g materia orgánica fermentada). En términos generales, la adición de lípidos a la dieta puede reducir las emisiones de metano por la disminución en la cantidad de materia orgánica fermentada en el rumen, en la actividad de las arqueas metanogénicas, y en el número de protozoos del rumen,

y mediante el uso de hidrógeno durante el proceso de biohidrogenación de los AG, desviándolo así de su uso para la metanogénesis ([Johnson y Johnson, 1995](#)). En el presente trabajo la reducción en la producción de metano no se debió a una disminución en la fermentación de la materia orgánica y podría obedecer a una inhibición de las arqueas metanogénicas. [Zhang y col. \(2008\)](#) observaron una reducción *in vitro* de la producción de metano por la adición al sustrato de fermentación de varios ácidos grasos libres (C18:0, C18:1 c9, C18:2 c9c12 y C18:3 c9c12c15), y atribuyeron dicha reducción a la acción directa de los ácidos grasos insaturados de 18 C sobre los microorganismos metanogénicos. En dicho trabajo se observaron diferencias en la magnitud del efecto dependiendo del ácido graso añadido (C18:1 c9 < C18:2 c9c12 < C18:3 c9c12c15), aunque en nuestro trabajo no hubo diferencias entre los tres aceites utilizados en el estudio. Debe tenerse en cuenta que en el trabajo de [Zhang y col. \(2008\)](#) se usaron ácidos grasos libres mientras que en el presente trabajo se han usado aceites comerciales en los que los AG están esterificados en los triglicéridos. Cabe destacar que en otros experimentos *in vitro* con el sistema RUSITEC también se observó una reducción similar en la producción de metano independientemente del ácido graso adicionado (C18:1 c9, C18:2 c9c12 o C18:3 c9c12c15) ([Jalc y col., 2007](#)).

Nuestros resultados también están en línea con los obtenidos por ([Czerkawski y col., 1966](#)), que observaron que la infusión ruminal de 72 g de C18:1 c9 o C18:2 c9c12 redujo a la mitad la producción de CH₄. Además, [Beauchemin y col. \(2007\)](#) observaron que, con ganado vacuno de cebo, las dietas que contenían aceite de girasol, sebo o semillas de girasol (en niveles de 34 g/kg) eran igualmente efectivas en la reducción de metano cuando se tenían en cuenta las diferencias en el consumo de alimento y en la digestión de la fibra. Este resultado indica que el proceso de biohidrogenación sólo puede jugar un papel menor en la reducción de las emisiones de metano, ya que con algunas de esas grasas (las más saturadas) apenas se produce dicha hidrogenación.

4.3.4.3 Perfil y biohidrogenación de los ácidos grasos de cadena larga

En términos generales, la tasa de biohidrogenación total de los AG de 18 C fue relativamente baja en todos los tratamientos (27 a 36 %) e incluso en la dieta control (54 %). Sin embargo, la biohidrogenación obtenida en el tratamiento

control fue similar a la registrada en otro estudio realizado utilizando el sistema RUSITEC en el que se fermentó un forraje de gramíneas y trébol suplementado con aceite de linaza (3 % de la MS) ([Khiaosa-Ard y col., 2009](#)). En estudios con el sistema RUSITEC y usando ensilado de maíz como sustrato de fermentación se han obtenido valores de hidrogenación similares a los obtenidos *in vivo*, aunque la adición de aceite de girasol (3 % de MS) tuvo un efecto levemente reductor especialmente en el caso del C18:1 c9 ([Jalc y col., 2010](#)). Dado que el sustrato de fermentación en el presente estudio tenía un contenido relativamente bajo en FND (ca. 22 %), es posible que la biohidrogenación esté acorde con lo observado en el estudio de [Doreau y Ferlay \(1994\)](#) utilizando dietas ricas en alimentos concentrados. Estos autores concluyeron que, a pesar de que normalmente la hidrogenación de C18:3 c9c12c15 está entre 85 y 100 % (promedio de 92 %) y la de C18:2 c9c12 en un rango de 70 a 95 % (promedio de 80 %); en el caso de dietas ricas en concentrado (70 a 93 % de la dieta) los valores de biohidrogenación pueden ser inferiores. Se ha sugerido que, con estas dietas, la selección de la microbiota favoreciéndose las especies y cepas amilolíticas puede llevar a una reducción de los procesos de hidrogenación. En esta línea, la sustitución de fibra por almidón en las raciones de ovejas provocó una reducción de la tasa de lipólisis y de biohidrogenación ([Gerson y col., 1985](#)).

El nivel de adición de aceite también afecta a la tasa de lipólisis y de biohidrogenación. [Beam y col. \(2000\)](#) evaluaron *in vitro*, utilizando heno de hierba como sustrato, los efectos de la adición de aceite de soja y de C18:2 c9c12 y observaron que la tasa de lipólisis y de biohidrogenación del aceite de soja disminuyeron con el aumento de la cantidad de aceite añadida (desde un 2 hasta un 10 % del pienso). La tasa de lipólisis disminuyó de un 41 a un 23 %/h y la de biohidrogenación del C18:2 se redujo de un 12 a un 6 %/h al aumentar la cantidad de grasa en el pienso. También se observó una disminución en la tasa de biohidrogenación de C18:1 como resultado de la adición de C18:2 c9c12, especialmente notoria a partir de la adición de un 6 % en el sustrato de fermentación.

La adición del aceite de oliva o de girasol (6 % de la MS) disminuyó la biohidrogenación total de los ácidos grasos insaturados de 18 C y la del C18:1 c9. Pero cuando se adicionó aceite de linaza (rico en C18:3 c9c12c15), el valor

estimado de la tasa de biohidrogenación del C18:1 c9 fue negativo, algo que no puede explicarse por un aumento en el contenido de C18:1 c9, ya que éste no es uno de los metabolitos intermediarios de la biohidrogenación del C18:3 c9c12c15 o del C18:2 c9c12 ([Shingfield y col., 2008](#)). Dicho valor puede ser el resultado de (i) no haber identificado y sumado dentro del conjunto de ácidos grasos de 18 C los compuestos intermediarios de la biohidrogenación de C18:3 c9c12c15, especialmente el C18:3 c9t11c15 ([Kemp y Dawson, 1968](#)) y el C18:2 t11c15 ([Collomb y col., 2004](#)) y (ii) el bajo contenido del C18:1 c9 en esta dieta y su baja biohidrogenación. En el tratamiento control se observó la mayor proporción del C18:1 c11, compuesto identificado por ([Shingfield y col., 2008](#)) como un ácido graso que se puede obtener en el proceso de biohidrogenación del C18:2 c9c12 cuando este se transforma en el isómero C18:2 c9c11.

En consonancia con la disminución en la biohidrogenación ocasionada por la adición de los aceites, se observó que en el conjunto de estas dietas la proporción de C18:0 fue menor que en el control, pero el efecto fue más notorio con la adición del aceite de oliva en el que predomina el C18:1 c9. La proporción C18:1 t11 fue menor en las dietas a las que se añadió algún aceite y mayor en la dieta control. Este resultado también podría estar determinado por la baja biohidrogenación; pero, además, es el resultado de expresar la concentración de los ácidos grasos en proporciones relativas (g/100 de metil ésteres de ácidos grasos) y de disponer de un tratamiento control sin adición de lípidos. La mayor proporción de C18:0 y C18:1 t11, y la mayor biohidrogenación observada en el caso del tratamiento control, hace pensar que en los otros tratamientos, como consecuencia de la adición de aceite, se produjo una perturbación de las rutas normales y de la eficiencia de biohidrogenación. En experimentos *in vitro*, [Troegeler-Meynadier y col. \(2006\)](#) observaron que la adición de C18:3 c9c12c15 puede inhibir la isomerización de C18:2 c9c12, y que la adición de C18:2 c9c12 puede, por sí misma, provocar la saturación de la capacidad microbiana para isomerizarlo a C18:2 c9t11. [Harfoot y col. \(1973\)](#) también observaron *in vitro* que una concentración inicial de C18:2 c9c12 igual o mayor a 1 mg/mL inhibía la producción de C18:0. Ambos mecanismos provocarían la disminución de la tasa de la biohidrogenación y de la concentración de C18:0. No obstante, con niveles de adición de 3,5 % de C18:1 c9, C18:2 c9c12 o C18:3 c9c12c15 a una dieta con

una elevada proporción (80 %) de forraje fermentada en el sistema RUSITEC, [Jalc y col. \(2007\)](#) apreciaron un aumento en la proporción de C18:1 *t*11 y predominancia del C18:0 independientemente de la fuente de aceite utilizada.

Dentro de los tratamientos en los que el sustrato se suplementó con aceite, se observó que, cuando se añadió aceite de girasol, la concentración de C18:1 *t*11 se situó entre la observada en el control y la de los otros tratamientos (aceites de oliva y linaza). El aceite de girasol es rico en C18:2 *c*9*c*12 que es la fuente principal para producción de C18:1 *t*11 en la ruta de biohidrogenación predominante en la que se forma C18:2 *c*9*t*11 en un paso intermedio ([Kepler y Tove, 1967](#)). Por el contrario, con la adición de C18:1 *c*9 (aceite de oliva) la proporción de C18:1 *t*11 es menor, pero aumenta la concentración de C18:1 *t*12, que es uno de múltiples isómeros intermediarios en las vías de biohidrogenación del C18:1 *c*9, en las que pueden formarse todos los ácidos grasos isómeros *trans* C18:1 con doble enlace en las posiciones 9 a 16 ([Mosley y col., 2002](#); [AbuGhazaleh y col., 2005](#)). Con la adición de C18:3 *c*9*c*12*c*15 (aceite de linaza) la proporción de C18:1 *t*11 también es menor que en el control, lo que indicaría que hay una limitación en la formación del C18:2 *t*11*c*15 o que no se está completando la hidrogenación de este intermediario con dos dobles enlaces. La adición de grasa puede haber alterado la población bacteriana y, por ende, el patrón de fermentación y la biohidrogenación de los ácidos grasos. Nuestros resultados parecen indicar que los aceites afectaron a las especies productoras de ácido butírico, que también participan en el proceso de biohidrogenación de los ácidos grasos. Se ha observado que hay diferencias entre las distintas especies del género *Butyrivibrio* en los ácidos grasos que isomerizan o hidrogenan. Así, *Butyrivibrio fibrisolvens* produce C18:1 *t*11 a partir de C18:2 *c*9*t*11 y C18:2 *t*9*t*11, *Butyrivibrio proteoclasticus* no crece en un medio con C18:2 *c*9*t*11 o C18:2 *t*10*c*12, y *Propionibacterium macnes* isomeriza el C18:2 *c*9*c*12 a C18:2 *t*10*c*12 pero no tiene la capacidad para biohidrogenarlo ([McKain y col., 2010](#)).

En el perfil de ácidos grasos de cadena larga no se registró la presencia de C18:2 *c*9*t*11 (ácido linoleico conjugado) lo que atribuimos a un resultado del procesamiento de la muestra debido a la reciente incorporación del protocolo analítico. Sin embargo, la literatura recoge un aumento importante en la concentración de C18:2 *c*9*t*11 como consecuencia de la administración de aceites

de cadena larga e insaturados de origen vegetal ([Loor y col., 2005](#); [Gagliostro y col., 2007](#); [Gomez-Cortes y col., 2008b](#); [Murphy y col., 2008](#); [Rego y col., 2009](#); [Jacob y col., 2012](#)). Aunque también se ha registrado que el suministro de aceite de oliva puede disminuir la concentración de C18:2 c9t11 en la leche de ovejas ([Gomez-Cortes y col., 2008a](#)) y que no todos los aceites vegetales poliinsaturados aumentan el C18:2 c9t11 en la leche de vacas ([Collomb y col., 2004](#)).

4.3.5 CONCLUSIONES

El patrón de fermentación ruminal cambia al añadir un 6 % de aceite de oliva, de girasol o de linaza a piensos de ovejas lecheras, observándose una disminución de la ratio acetato:propionato y una reducción de la producción de metano y de la liberación de amoníaco, sin llegar a afectar a la eficiencia de síntesis de la proteína microbiana. La adición de estos aceites disminuye la actividad amilolítica y celulolítica en los fermentadores, especialmente con el aceite de linaza. La adición de aceites vegetales de oliva, girasol o linaza disminuye la hidrogenación de los ácidos grasos de cadena larga en el rumen, afectando de forma diferente a la saturación de cada ácido graso dependiendo de la composición en ácidos grasos insaturados de cada aceite utilizado como suplemento. De esta forma, el perfil de ácidos grasos de la digesta depende, por un lado, del perfil de ácidos grasos del aceite añadido al pienso y, por otro lado, de la medida en que cada aceite afecte a la hidrogenación de los ácidos grasos insaturados oleico, linoleico y linolénico.

4.3.6 BIBLIOGRAFIA

- Abel, H., Schroder, B., Lebzien, P., and Flachowsky, G. (2006). Effects of defaunation on fermentation characteristics and biotin balance in an artificial rumen-simulation system (RUSITEC) receiving diets with different amounts and types of cereal. *British Journal of Nutrition*, 95, 99-104.
- AbuGhazaleh, A. A., and Jacobson, B. N. (2007). Production of trans C18 : 1 and conjugated linoleic acid in continuous culture fermenters fed diets containing fish oil and sunflower oil with decreasing levels of forage. *Animal*, 1, 660-665.
- AbuGhazaleh, A. A., Riley, M. B., Thies, E. E., and Jenkins, T. C. (2005). Dilution rate and pH effects on the conversion of oleic acid to trans C18:1 positional isomers in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 88, 4334-4341.
- AOAC. (1999). *Official methods of analysis* (16th ed.). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- AOCS. (2008). *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society* (5th ed.). Urbana, IL. U.S.A: AOCS
- Beam, T. M., Jenkins, T. C., Moate, P. J., Kohn, R. A., and Palmquist, D. L. (2000). Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *Journal of Dairy Science*, 83, 2564-2573.
- Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., and Petit, H. V. (2007). Methane abatement strategies for cattle: Lipid supplementation of diets. *Canadian Journal of Animal Science*, 87, 431-440.
- Brooks, C. C., Garner, G. B., Gehrke, C. W., Muhrer, M. E., and Pfander, W. H. (1954). The effect of added fat on the digestion of cellulose and protein by ovine rumen microorganisms. *Journal of Animal Science*, 13, 758-764.
- Broudiscou, L., and Lassalas, B. (1991). Linseed oil supplementation of the diet of sheep: Effect on the *in vitro* fermentation of amino acids and proteins by rumen microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*, 33, 161-171.
- Carro, M. D., Lebzien, P., and Rohr, K. (1995). Effects of pore size of nylon bags and dilution rate on fermentation parameters in a semi-continuous artificial rumen. *Small Ruminant Research*, 15, 113-119.
- Carro, M. D., and Miller, E. L. (1999). Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semi-continuous culture system (RUSITEC). *British Journal of Nutrition*, 82, 149-157.
- Chalupa, W., Rickabaugh, B., Kronfeld, D. S., and Sklan, D. (1984). Rumen fermentation *in vitro* as influenced by long chain fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 67, 1439-1444.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R. M., and Doreau, M. (2000). Ruminant milk fat plasticity: Nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annales de Zootechnie*, 49, 181-205.
- Collomb, M., Sieber, R., and Butikofer, U. (2004). CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. *Lipids*, 39, 355-364.
- Czerkawski, J. W., Blaxter, K. L., and Wainman, F. W. (1966). The metabolism of oleic, linoleic and linolenic acids by sheep with reference to their effects on methane production. *British Journal of Nutrition*, 20, 349-362.

- Czerkawski, J. W., and Breckenridge, G. (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (RUSITEC). *British Journal of Nutrition*, 38, 371-384.
- Czerkawski, J. W., and Breckenridge, G. (1979). Experiments with the long-term rumen simulation technique (RUSITEC); response to supplementation of basal rations. *British Journal of Nutrition*, 42, 217-228.
- Dewhurst, R. J., Shingfield, K. J., Lee, M. R. F., and Scollan, N. D. (2006). Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 168-206.
- Doreau, M., and Ferlay, A. (1994). Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 45, 379-396.
- Doreau, M., and Ferlay, A. (1995). Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: A review. *Livestock Production Science*, 43, 97-110.
- Doreau, M., Laverroux, S., Normand, J., Chesneau, G., and Glasser, F. (2009). Effect of linseed fed as rolled seeds, extruded seeds or oil on fatty acid rumen metabolism and intestinal digestibility in cows. *Lipids*, 44, 53-62.
- Firkins, J. L., Bowman, J. G. P., Weiss, W. P., and Naderer, J. (1991). Effects of protein, carbohydrate, and fat sources on bacterial colonization and degradation of fiber *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 74, 4273-4283.
- France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M., Lopez, S., and Bannink, A. (2000). Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: Derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal of Nutrition*, 83, 143-150.
- Fujimoto, K., Kimoto, H., Shishikura, M., Endo, Y., and Ogimoto, K. (1993). Biohydrogenation of linoleic-acid by anaerobic-bacteria isolated from rumen. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57, 1026-1027.
- Gagliostro, G. A., Rodriguez, M. A., Pellegrini, P., Muset, G., Gatti, P., Garcarena, D. A., Fernandez, H. H., Oporto, M., Ferlay, A., and Chilliard, Y. (2007). Effect of ruminal infusion of sunflower oil (SO) or seeds (SS) combined or not with fish oil (FO) on conjugated linoleic acid (CLA) in milk. *Journal of Animal Science*, 85, 117-117.
- Galbraith, H., and Miller, T. B. (1973). Effect of metal cations and pH on antibacterial activity and uptake of long-chain fatty-acids. *Journal of Applied Bacteriology*, 36, 635-646.
- Gerson, T., John, A., and King, A. S. D. (1985). The effects of dietary starch and fibre on the *in vitro* rates of lipolysis and hydrogenation by sheep rumen digesta. *The Journal of Agricultural Science*, 105, 27-30.
- Getachew, G., DePeters, E. J., Robinson, P. H., and Taylor, S. J. (2001). *In vitro* rumen fermentation and gas production: Influence of yellow grease, tallow, corn oil and their potassium soaps. *Animal Feed Science and Technology*, 93, 1-15.
- Gomez-Cortes, P., Frutos, P., Mantecon, A. R., Juarez, M., de la Fuente, M. A., and Hervás, G. (2008a). Addition of olive oil to dairy ewe diets: Effect on milk fatty acid profile and animal performance. *Journal of Dairy Science*, 91, 3119-3127.
- Gomez-Cortes, P., Frutos, P., Mantecon, A. R., Juarez, M., de la Fuente, M. A., and Hervás, G. (2008b). Milk production, conjugated linoleic acid content, and *in vitro* ruminal fermentation in response to high levels of soybean oil in dairy ewe diet. *Journal of Dairy Science*, 91, 1560-1569.

- Harfoot, C., Noble, R., and Moore, J. (1973). Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen microorganisms *in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24, 961-970.
- Harris, W. S. (2008). Linoleic acid and coronary heart disease. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 79, 169-171.
- Jacob, A. B., Balakrishnan, V., and Kathirvelan, C. (2012). Effect of amount and source of vegetable oils in a high fibrous cattle diet on *in vitro* rumen fermentation, nutrient degradability and rumen cis-9, trans-11 CLA concentration. *Journal of Applied Animal Research*, 40, 148-153.
- Jalc, D., Certik, M., Kundrikova, K., and Namestkova, P. (2007). Effect of unsaturated C-18 fatty acids (oleic, linoleic and alpha-linolenic acid) on ruminal fermentation and production of fatty acid isomers in an artificial rumen. *Veterinarni Medicina*, 52, 87-94.
- Jalc, D., Potkanski, A., Szumacher-Strabel, M., Kowalczyk, J., and Cieslak, A. (2006a). The effect of a forage diet and different fat sources on rumen fermentation *in vitro*. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 15, 129-132.
- Jalc, D., Potkanski, A., Szumacher-Strabel, M., Kowalczyk, J., and Cieslak, A. (2006b). The effect of a high concentrate diet and different fat sources on rumen fermentation *in vitro*. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 15, 137-140.
- Jalc, D., Varadyova, Z., and Laukova, A. (2010). Effect of inoculated corn silage enriched with sunflower oil on rumen fermentation and lipid metabolism in an artificial rumen (RUSITEC). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 78-84.
- Jenkins, T. C. (1987). Effect of fats and fatty acid combinations on ruminal fermentation in semi-continuous *in vitro* cultures. *Journal of Animal Science*, 64, 1526-1532.
- Jenkins, T. C. (1993). Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 76, 3851-3863.
- Johnson, D., Jr., Dolge, K. L., Rousseau, J. E., Jr., Teichman, R., Eaton, H. D., Beall, G., and Moore, L. A. (1956). Effect of addition of Inedible tallow to a calf starter fed to Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 39, 1268-1279.
- Johnson, K. A., and Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73, 2483-2492.
- Kemp, P., and Dawson, R. (1968). Isomerization of linolenic acid by rumen microorganisms. *Biochemical Journal*, 109, 477-478.
- Kepler, C. R., and Tove, S. B. (1967). Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Iii. Purification and properties of a linoleate δ^{12} -cis, δ^{11} -trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 5686-5692.
- Khiaosa-Ard, R., Bryner, S. F., Scheeder, M. R. L., Wettstein, H. R., Leiber, F., Kreuzer, M., and Soliva, C. R. (2009). Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal alpha-linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. *Journal of Dairy Science*, 92, 177-188.
- Kolver, E. S., de Veht, M. J., Roche, J. R., and Chand, A. (2002). Enhancing ruminal concentrations of conjugated linoleic acid and trans vaccenic acid. *Journal of Dairy Science*, 85 (Suppl.1), 183 (Abstr.).
- Kowalczyk, J., rskov, E. R., Robinson, J. J., and Stewart, C. S. (1977). Effect of fat supplementation on voluntary food intake and rumen metabolism in sheep. *British Journal of Nutrition*, 37, 251-257.

- Loor, J. J., Ueda, K., Ferlay, A., Chilliard, Y., and Doreau, M. (2005). Intestinal flow and digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids (CLA) in dairy cows fed a high-concentrate diet supplemented with fish oil, linseed oil, or sunflower oil. *Animal Feed Science and Technology*, 119, 203-225.
- Lough, A. K., and Smith, A. (1976). Influence of the products of phospholipolysis of phosphatidylcholine on micellar solubilization of fatty acids in the presence of bile salts. *British Journal of Nutrition*, 35, 89-96.
- Luna, P., Bach, A., Juárez, M., and de la Fuente, M. A. (2008). Influence of diets rich in flax seed and sunflower oil on the fatty acid composition of ewes' milk fat especially on the level of conjugated linoleic acid, n-3 and n-6 fatty acids. *International Dairy Journal*, 18, 99-107.
- Machmüller, A., Ossowski, D. A., Wanner, M., and Kreuzer, M. (1998). Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation *in vitro* (RUSITEC). *Animal Feed Science and Technology*, 71, 117-130.
- Maia, M. R. G., Chaudhary, L. C., Figueres, L., and Wallace, R. J. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91, 303-314.
- Martin, C., Rouel, J., Jouany, J. P., Doreau, M., and Chilliard, Y. (2008). Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *Journal of Animal Science*, 86, 2642-2650.
- McKain, N., Shingfield, K. J., and Wallace, R. J. (2010). Metabolism of conjugated linoleic acids and 18:1 fatty acids by ruminal bacteria: Products and mechanisms. *Microbiology*, 156, 579-588.
- Mosley, E. E., Powell, G. L., Riley, M. B., and Jenkins, T. C. (2002). Microbial biohydrogenation of oleic acid to trans isomers *in vitro*. *Journal of Lipid Research*, 43, 290-296.
- Murphy, J. J., Coakley, M., and Stanton, C. (2008). Supplementation of dairy cows with a fish oil containing supplement and sunflower oil to increase the CLA content of milk produced at pasture. *Livestock Science*, 116, 332-337.
- Oldick, B. S., and Firkins, J. L. (2000). Effects of degree of fat saturation on fiber digestion and microbial protein synthesis when diets are fed twelve times daily. *J. Anim Sci.*, 78, 2412-2420.
- Palmquist, D. L. (1995). Digestibility of cotton lint fiber and whole oilseeds by ruminal microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*, 56, 231-242.
- Palmquist, D. L., and Conrad, H. R. (1980). High fat rations for dairy cows. Tallow and hydrolyzed blended fat at two intakes. *Journal of Dairy Science*, 63, 391-395.
- Palmquist, D. L., and Jenkins, T. C. (1980). Fat in lactation rations: Review. *Journal of Dairy Science*, 63, 1-14.
- Palmquist, D. L., Jenkins, T. C., and Joyner, A. E., Jr. (1986). Effect of dietary fat and calcium source on insoluble soap formation in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 69, 1020-1025.
- Potkanski, A., Szumacher-Strabel, M., Kowalczyk, J., Cieslak, A., and Czauderna, M. (2001). A note on the effect of different amounts and types of fat on the fatty acid composition of duodenal digesta in sheep. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 10, 627-632.

- Rego, O. A., Alves, S. P., Antunes, L. M. S., Rosa, H. J. D., Alfaia, C. F. M., Prates, J. A. M., Cabrita, A. R. J., Fonseca, A. J. M., and Bessa, R. J. B. (2009). Rumen biohydrogenation-derived fatty acids in milk fat from grazing dairy cows supplemented with rapeseed, sunflower, or linseed oils. *Journal of Dairy Science*, 92, 4530-4540.
- SAS. (2002). *User's guide: Statistics (release 8.02)*. Cary, NC, USA: SAS Inst., Inc.
- Schmidely, R., Glasser, F., Doreau, M., and Sauvant, D. (2008). Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors. 1. Total fatty acids. *Animal*, 2, 677-690.
- Shingfield, K. J., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., and Griinari, J. M. (2008). Effect of incremental levels of sunflower-seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows. *British Journal of Nutrition*, 99, 971-983.
- Steel, R. G. D., and Torrie, J. H. (1981). *Principles and procedures of statistics: A biometrical approach* (2nd ed.). New York: McGraw-Hill.
- Sutton, J. D., Knight, R., McAllan, A. B., and Smith, R. H. (1983). Digestion and synthesis in the rumen of sheep given diets supplemented with free and protected oils. *British Journal of Nutrition*, 49, 419-432.
- Szumacher-Strabel, M., Cieslak, A., Potkanski, A., Kowalczyk, J., and Czauderna, M. (2001). The effects of different amounts and types of fat on rumen microbial protein synthesis in sheep. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 10, 97-101.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., and France, J. (1994). A simple gas-production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48, 185-197.
- Toral, P. G., Belenguer, A., Frutos, P., and Hervás, G. (2009). Effect of the supplementation of a high-concentrate diet with sunflower and fish oils on ruminal fermentation in sheep. *Small Ruminant Research*, 81, 119-125.
- Troegeler-Meynadier, A., Bret-Bennis, L., and Enjalbert, F. (2006). Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. *Reproduction Nutrition Development*, 46, 713-724.
- Ueda, K., Ferlay, A., Chabrot, J., Loo, J. J., Chilliard, Y., and Doreau, M. (2003). Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage:concentrate ratios. *Journal of Dairy Science*, 86, 3999-4007.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., and Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.
- Yáñez-Ruiz, D. R., Williams, S., and J. Newbold, C. (2007). The effect of absence of protozoa on rumen biohydrogenation and the fatty acid composition of lamb muscle. *British Journal of Nutrition*, 97, 938-948.
- Zhang, C. M., Guo, Y. Q., Yuan, Z. P., Wu, Y. M., Wang, J. K., Liu, J. X., and Zhu, W. Y. (2008). Effect of octadeca carbon fatty acids on microbial fermentation, methanogenesis and microbial flora *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 146, 259-269.

4.4 EFECTO DE LA ADICION DE ACEITES DE GIRASOL, PESCADO O ALGAS AL PIENSO SOBRE EL PATRÓN DE FERMENTACIÓN, LA PRODUCCIÓN DE METANO Y LA BIOHIDROGENACIÓN RUMINAL

4.4.1 INTRODUCCIÓN

Debido a los beneficios que puede representar para la salud humana el consumo de algunos ácidos grasos (AG) ([Wang y Lee, 2015](#)), la investigación y el desarrollo tecnológico en el campo de la alimentación de rumiantes se ha planteado el reto de incrementar los niveles de C18:2 *c9t11* en la grasa de la carne y la leche mediante cambios en la alimentación de los animales. Este ácido graso se produce en el proceso de biohidrogenación ruminal del C18:2 *c9c12* y también se puede producir en la glándula mamaria a partir de la deshidrogenación del C18:1 *t11*, compuesto que a su vez también aparece como metabolito intermediario en la biohidrogenación ruminal de los AG ([Shingfield y Griinari, 2007](#)). Una de las estrategias que se ha propuesto para aumentar la concentración de estos AG es la de añadir a la dieta aceites ricos en C18:2 *c9c12* o de AG poliinsaturados ([Khanal y Olson, 2004](#); [Palmquist, 2007](#); [Jacob y col., 2012](#)). También se ha propuesto disminuir la conversión de C18:1 *t11* en C18:0, lo que incrementaría la llegada del primero a la glándula mamaria y su posterior conversión C18:2 *c9t11*. Se ha observado que este último efecto es posible mediante la incorporación de aceite de pescado o aceite de algas en la dieta ([AbuGhazaleh y Jenkins, 2004](#); [Toral y col., 2010](#)). Sin embargo, aún existe un conocimiento limitado de los efectos de la combinación de aceites marinos y aceites vegetales en la dieta sobre la fermentación microbiana y el metabolismo lipídico en el rumen ([Bernard y col., 2016](#)). En los experimentos en los que se han estudiado los efectos de ambas estrategias (adición de AG poliinsaturados o reducción de la hidrogenación completa ruminal de los AG) por separado o de forma conjunta, se han observado resultados inconsistentes ([Chilliard y Ferlay, 2004](#)). Además, se ha puesto de manifiesto la existencia de interacciones entre diferentes aceites y que sus efectos dependen del tipo de dieta que consuma el animal, especialmente con raciones ricas en concentrados ([Vahmani y col., 2013](#)), lo que puede provocar alteraciones en la fermentación y la biohidrogenación en el

rumen. Además, los efectos pueden ser diferentes en las distintas especies de rumiantes ([Toral y col., 2014](#)). Es, por ello, necesario entender de manera más precisa cuáles son los factores que determinan la manifestación o no de los efectos deseados con este tipo de dietas. El sistema RUSITEC es una técnica de evaluación de dietas que permite un control estandarizado y preciso de las condiciones de fermentación y el seguimiento diario y detallado de las variables que permiten interpretar el patrón de la fermentación que se lleva a cabo bajo las condiciones determinadas por los substratos de interés.

El objetivo de este estudio fue investigar los efectos de la adición de aceite de girasol, o de mezclas de este aceite con aceite de pescado o de algas marinas, a raciones ricas en concentrados sobre el patrón de fermentación ruminal, la producción de metano y la biohidrogenación de los ácidos grasos en fermentadores RUSITEC.

4.4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Tal y cómo se describió en el capítulo 3, el estudio se llevó a cabo utilizando 16 vasijas de fermentación (de 650 mL de volumen útil) diseñadas según el sistema de simulación ruminal RUSITEC ([Czerkawski y Breckenridge, 1977](#)). Se utilizó como inóculo el contenido ruminal de ovejas de raza merina, que recibían una dieta a base de un heno de hierba (70 %) y un alimento concentrado (30 %).

En el primer día del experimento, se inició el periodo de adaptación tras la inoculación de cada vasija con 400 mL de líquido ruminal filtrado y diluido en 250 mL de saliva artificial y con 80 g de un residuo de digesta ruminal obtenido tras haber extraído el líquido.

4.4.2.1 Tratamientos experimentales

El diseño del experimento consistió en cuatro tratamientos diferenciados entre sí por el tipo de aceite que se añadió al pienso utilizado como sustrato de fermentación. En el tratamiento control la dieta consistió en un pienso integral o ración completa para ovejas en lactación que no contenía ninguna grasa como ingrediente. Los otros tres tratamientos fueron el mismo pienso utilizado en el tratamiento control al que se añadió aceite de girasol sólo o en combinación con un aceite de origen marino (de pescado o de algas).

Tabla 15. Ingredientes y composición química de las dietas experimentales

Ítem	Dietas experimentales ¹			
	Control	Girasol	Pescado	Algas
Ingredientes de la dieta, % de MS				
Maíz	25,0	24,5	24,3	24,3
Cebada	15,0	14,7	14,6	14,6
Torta de soja	20,0	19,6	19,4	19,4
Heno de alfalfa	20,0	19,6	19,4	19,4
Pulpa de remolacha	10,0	9,8	9,7	9,7
Melaza de remolacha	5,5	5,4	5,3	5,3
Bicarbonato sódico	1,5	1,5	1,5	1,5
Carbonato cálcico	1,4	1,4	1,4	1,4
Fosfato bicálcico	0,6	0,6	0,6	0,6
Corrector vitamínico mineral	0,5	0,5	0,5	0,5
Sal marina	0,5	0,5	0,5	0,5
Aceite de girasol ²	-	2,0	2,0	2,0
Aceite de pescado ³	-	-	1,0	-
Aceite de algas ⁴	-	-	-	1,0
Composición química, % de MS				
Materia orgánica	89,6	89,5	89,4	89,4
Proteína bruta	19,1	18,9	18,4	18,5
Fibra neutro detergente	35,4	39,0	36,4	36,8
Fibra ácido detergente	13,9	14,5	14,1	14,2
Lignina	1,5	1,7	1,6	1,6
Extracto etéreo	1,6	3,7	4,7	4,9
Ácidos grasos (AG) en el pienso, % del total AG				
C14:0	1,09	0,60	1,30	1,78
C16:0	20,9	14,7	15,1	15,4
Total de AG C18	76,3	82,8	72,2	66,7
C20:5n3			1,35	0,27
C22:5n6			0,28	3,73
C22:6n3			4,05	8,85
C24:0				0,34
Otros	1,20	1,33	5,04	2,44
Perfil de C18 en el pienso, % del total AG C18				
C18:0	3,8	5,0	6,5	5,2
C18:1 c9	31,8	36,4	38,2	36,6
C18:2 c9c12	50,1	52,0	48,2	51,6
C18:3 c9c12c15	14,3	6,7	7,2	6,6

¹ **Control** = sin adición de aceite; **Girasol** = adición de aceite de girasol (2 % de MS);

Pescado = adición de aceite de girasol (2 % de MS) y de pescado (1 % de MS);

Algas = adición de aceite de girasol (2 % de MS) y de algas (1 % de MS),

Composición de los aceites adicionados (% del total de metil ésteres de ácidos grasos):

Aceite de girasol:

8,7 % C16:0, 5,3 % C18:0, 35,6 % C18:1 c9, 47,3 % C18:2 c9c12 y 0,3 % C18:3 c9c12c15

Aceite de pescado: 4,1 % C14, 16,6 % C16:0, 6,8 % C18:0, 17,5 % C18:1 c9, 2,3 % C18:2 c9c12,

3,8 % C18:3 c9c12c15, 6,6 % C20:5n3, 1,4 % C22:5n6 y 19,9 % C22:6n3

Aceite de algas: 6,4 % C14:0, 18,4 % C16:0, 1,0 % C18:0, 1,8 % C18:1 c9, 0,5 % C18:2 c9c12,

0,1 % C18:3 c9c12c15, 1,7 % C24:0, 1,3 % C20:5n3, 18,3 % C22:5n6 y 43,5 % C22:6n3

De esta forma, los tratamientos experimentales fueron: pienso control sin aceite añadido (**Control**), pienso control al que se añadió un 2 % de aceite de girasol (**Girasol**), pienso control suplementado con un 2 % de aceite de girasol más un 1 % de aceite de pescado (**Pescado**) y pienso control suplementado con un 2 % de aceite de girasol más un 1 % de aceite de algas (**Algas**). Los

ingredientes y la composición química de los piensos resultantes se presentan en la Tabla 15. Los piensos fueron preparados y mezclados cada tres días y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

4.4.2.2 Recogida y análisis de muestras

Tras el periodo de adaptación se procedió al registro de mediciones y la recogida de muestras (producción total de gas y CH₄, volumen de líquido efluente y concentración en el mismo de ácidos grasos volátiles (AGV), L-lactato y amoníaco) durante un periodo de 14 días. También se determinó la desaparición de sustrato tras 48 h de incubación y la síntesis de proteína microbiana (utilizando ¹⁵N como marcador). El último día del experimento, se recogieron y prepararon muestras para el análisis de ácidos grasos de cadena larga, que fueron congeladas a -80 °C y liofilizadas. Los ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía de gases tras la extracción de la grasa y la metilación de los ácidos grasos. Los procedimientos para el registro de datos, la recogida de muestras y los análisis de laboratorio han sido descritos en detalle en el capítulo 3.

4.4.2.3 Evaluación de los efectos sobre la actividad fermentativa

Una vez finalizado el experimento, el contenido líquido de las vasijas de fermentación fue utilizado para evaluar la actividad fermentativa sobre diversos sustratos como consecuencia de los posibles cambios adaptativos de la población microbiana a los tratamientos experimentales, según lo propuesto por [Carro y Miller \(1999\)](#). El líquido recuperado en cada vasija sirvió como inóculo y medio de cultivo para realizar incubaciones en cultivos no renovados de microorganismos ruminales (seriados o “discontinuos”), donde se midió la respuesta en la cinética de fermentación a partir de la curva de producción de gas. Para evaluar la actividad de fermentación del líquido contenido en cada vasija, se utilizaron tres sustratos para realizar las incubaciones: celulosa, almidón y la misma dieta utilizada en el tratamiento de control (pienso control sin grasa añadida). Estos sustratos fueron molidos a través de una malla de 1 mm.

Una vez finalizado el experimento en los fermentadores de simulación ruminal, se extrajeron las bolsas con residuos de incubación y se lavaron con saliva artificial. Tras el lavado, la saliva se añadió al líquido contenido en la vasija (aproximadamente unos 600 mL). De dicho líquido, se dosificaron 50 mL en

botellas de suero de 120 mL que contenían 500 mg de uno de los sustratos mencionados anteriormente. Este proceso se realizó bajo un flujo continuo de CO₂ para limitar la exposición al aire, y manteniendo el líquido a una temperatura aproximada de 39 °C. Se mantuvo el flujo de CO₂ en el espacio de cabeza de las botellas para retirar el O₂ (condiciones de anaerobiosis) y posteriormente las botellas fueron cerradas con tapones de goma y selladas con cápsulas de aluminio. Se agitaron vigorosamente para mezclar el sustrato y el inóculo y se introdujeron inmediatamente en una incubadora a 39 °C. La producción de gas acumulada en el espacio de cabeza se midió tras 2, 4, 6, 8, 12, 22, 32, 46, 72, 96 y 120 h de incubación utilizando un transductor de presión según la técnica descrita por [Theodorou y col. \(1994\)](#).

4.4.2.4 Análisis de composición química

Los piensos experimentales y los residuos de incubación se analizaron para determinar su contenido en materia seca (método AOAC 934.01), cenizas (método AOAC 942.05) y N (método AOAC 984.13) de acuerdo con la [AOAC \(1999\)](#). Las determinaciones de FND (método AOAC 2002.04) y FAD (método AOAC 973.18) se llevaron a cabo de acuerdo con el método de [Van Soest y col. \(1991\)](#), utilizando un analizador de fibra ANKOM220 (ANKOM Technology Corporation, NY, EE.UU.). El extracto etéreo fue determinado por tecnología de filtro de mangas ([AOCS, 2008; Procedimiento Am 5-04](#)).

4.4.2.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el procedimiento GLM de [SAS \(2002\)](#) para un diseño completamente aleatorio a una vía con cuatro réplicas por tratamiento ([Steel y Torrie, 1981](#)). Los cuatro tratamientos experimentales se asignaron al azar a las vasijas de fermentación (16), de forma que para cada tratamiento se dispuso de cuatro vasijas. Cada vasija fue considerada una unidad experimental independiente, dando como resultado las cuatro réplicas por tratamiento.

El modelo estadístico fue $y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$, donde y_{ij} representa el valor para cada observación individual correspondiente al tratamiento i en la vasija j , μ es la media general; T_i es el efecto del tratamiento debido al aceite añadido al pienso ($i = 1 \dots 4$, control, girasol, pescado o algas) y ε_{ij} es el término error residual que

corresponde al efecto aleatorio de la variabilidad entre réplicas dentro de cada tratamiento. Se consideró que un efecto fue estadísticamente significativo si $P < 0,05$ y que había una tendencia cuando $P < 0,10$. Se realizó una comparación múltiple entre los valores medios de los cuatro tratamientos utilizando el test de Tukey. Se realizó un contraste *a priori* para comprobar el efecto de la adición de aceite, en el que se comparó el tratamiento control (sin grasa añadida) frente a la media de los tres tratamientos en los que se añadió aceite al pienso. Además, se realizó otro contraste *a priori* para comprobar el efecto de la adición de aceite de origen marino, en el que se comparó el tratamiento Girasol (pienso suplementado sólo con aceite de girasol) frente a la media de los dos tratamientos en los que se añadió una mezcla de aceite de girasol (2 %) con un aceite de origen marino (1 % de aceite de pescado o de algas).

Para el análisis de las cinéticas de fermentación en los cultivos no renovados de microorganismos ruminales, las curvas de producción de gas se ajustaron al modelo exponencial $G = A \left[1 - e^{-c(t-L)} \right]$ ([France y col., 2000](#)), donde G (mL/g MS incubada) es la producción de gas acumulada en el tiempo de incubación t (h), A (mL/g MS incubada) es la producción asintótica de gas, c (h^{-1}) es el ritmo fraccional de fermentación del sustrato y L (h) es el tiempo de retraso. El ritmo medio de fermentación del sustrato (mL/h) se calculó como $\frac{Ac}{2 \left[\ln(2) + cL \right]}$. Para analizar el efecto del tipo de aceite añadido sobre la cinética de fermentación de cada sustrato (almidón, celulosa o pienso), los parámetros descritos anteriormente se evaluaron mediante análisis de la varianza, utilizando un diseño de parcelas divididas en el que se consideró la vasija dentro del tratamiento como el término de error ([Steel y Torrie, 1981](#)).

4.4.3 RESULTADOS

El pH fue ligeramente inferior ($P = 0,027$) en los tratamientos con aceite (Girasol, Pescado o Algas) que en el control. La desaparición de la FND fue superior en los tratamientos con aceite que en el control (53,5 vs. 57,2, 56,2 y 55,3 % para Control, Girasol, Pescado y Algas, respectivamente). La desaparición del EE fue significativamente mayor en los tratamientos con aceite (65,4, 81,5, 85,0 y 88,9 para Control, Girasol, Pescado y Algas, respectivamente) (Tabla 16). No hubo diferencias en la desaparición de MS, MO sin grasa, FAD o PB.

No hubo diferencias entre tratamientos respecto al total de gas producido diariamente. Sin embargo, la prueba de contraste y la comparación entre tratamientos mostró que la adición de los aceites (Girasol, Pescado o Algas) ocasionó una reducción en la concentración de metano y, en el caso de los tratamientos Pescado y Algas, también se observó una disminución en la producción diaria de metano respecto al tratamiento Control. La producción de metano por gramo de materia orgánica fermentable tuvo el mismo comportamiento que la producción diaria de metano, siendo menor en el caso de los tratamientos Pescado y Algas que en el tratamiento Control, mientras que el valor fue intermedio para el tratamiento Girasol.

La producción total de AGV fue mayor en el conjunto de los tratamientos con aceite (Girasol, Pescado o Algas) que en el control. En todos los tratamientos la producción de butirato fue superior a la producción de propionato. No obstante, se observó que la producción de propionato y valerato fue mayor en los tratamientos Pescado y Algas que en el tratamiento Control, y que los valores para el tratamiento Girasol se ubicaron en una posición intermedia. No hubo diferencias entre tratamientos en la producción de acetato, butirato e isoácidos. Consecuentemente, la ratio acetato:propionato fue menor en los tratamientos Pescado y Algas que en el Control. La concentración de lactato también fue mayor con las raciones Pescado y Algas que en el Control (Tabla 16).

Respecto a la concentración de amoníaco y la síntesis de proteína microbiana, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 16).

En cuanto a la actividad fermentativa estimada a partir de la producción de gas obtenida usando como medio de cultivo el contenido líquido de las vasijas de fermentación del RUSITEC, solo se observaron efectos significativos de los aceites en el caso del tiempo de retraso en el inicio de la fermentación y en el ritmo medio de fermentación del almidón. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en los parámetros de fermentación del pienso control o de la celulosa (Tabla 17).

Tabla 16 Efecto de la adición al pienso de aceites de girasol, pescado o algas sobre la fermentación ruminal

Ítem	Tratamientos ¹				DER ²	Efecto tratamiento	Contraste ³ Control vs. (Aceite)	Contraste ⁴ Girasol vs (Pescado/Algas)
	Control	Girasol	Pescado	Algas		P =	P =	P =
Efluente, mL/d	594	585	628	591	39,8	0,458	0,786	0,346
pH	6,78	6,73	6,74	6,72	0,029	0,100	0,027	0,892
Coefficientes de desaparición, g/100 g incubados								
Materia seca (sin grasa)	73,3	73,0	73,1	73,7	2,09	0,958	0,973	0,768
Materia orgánica (sin grasa)	72,7	72,2	72,3	73,1	2,20	0,926	0,939	0,705
Fibra neutro detergente	53,5	57,2	56,2	55,3	2,00	0,132	0,039	0,340
Fibra ácido detergente	27,9	28,6	30,8	28,9	3,03	0,596	0,415	0,526
Proteína bruta	70,6	72,3	71,2	72,8	3,00	0,754	0,455	0,863
Extracto etéreo	65,4 ^b	81,5 ^a	85,0 ^a	88,9 ^a	4,87	0,002	< 0,001	0,010
Producción de gas:								
Total, L/d	3,03	2,95	3,05	2,91	0,173	0,658	0,583	0,784
CH ₄ , %	8,98 ^a	7,86 ^b	7,54 ^b	7,23 ^b	0,452	0,002	< 0,001	0,124
CH ₄ , mmol/d	11,84 ^a	9,91 ^{ab}	9,23 ^b	9,42 ^b	0,894	0,007	< 0,001	0,358
CH ₄ , mmol/g MOF ⁵	1,20 ^a	1,01 ^{ab}	0,94 ^b	0,94 ^b	0,100	0,011	0,002	0,334
AGV, mmol/d								
Acetato	25,5	27,4	26,5	26,7	0,97	0,175	0,061	0,257
Propionato	6,94 ^c	7,38 ^{bc}	8,36 ^{ab}	8,46 ^a	0,353	< 0,001	< 0,001	0,002
Butirato	8,30	8,87	8,81	8,51	0,422	0,297	0,144	0,433
Valerato	2,56 ^c	2,88 ^b	3,19 ^a	3,04 ^{ab}	0,105	< 0,001	< 0,001	0,006
Isoácidos	2,24	2,29	2,46	2,41	0,106	0,075	0,060	0,070
Total de AGV	47,8 ^b	51,3 ^a	51,4 ^a	51,3 ^a	1,68	0,055	0,008	0,966
Ratio acetato : propionato	3,72 ^a	3,54 ^{ab}	3,19 ^b	3,18 ^b	0,198	0,012	0,009	0,014
L-lactato, mg/d	9,1 ^c	10,1 ^{bc}	14,0 ^a	13,5 ^{ab}	1,63	0,003	0,004	0,004
Metabolismo nitrogenado								
N amoniacal, mg/d	171	156	171	165	8,5	0,140	0,211	0,062
Proteína microbiana, g/d	1,39	1,35	1,41	1,37	0,145	0,924	0,894	0,638
Proteína microbiana, g/100 g MOF	14,1	13,7	14,3	13,7	1,51	0,919	0,842	0,728

¹ Control = sin grasa añadida; Girasol = adición de aceite de girasol (2 % de MS); Pescado = adición de aceite de girasol (2 % de MS) y pescado (1 % de MS);

Algas = adición de aceite de girasol (2 % of MS) y algas (1 % de MS)

² DER = desviación estándar residual

³ Comparación entre el tratamiento control y otros tratamientos (adición de aceites)

⁴ Comparación entre el tratamiento Girasol y los tratamientos que incluyen aceites marinos (Pescado o Algas) como suplemento al aceite de girasol

⁵ MOF = Materia orgánica fermentable

^{a,b,c} Dentro de una misma línea, las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos ($P < 0,05$, prueba de Tukey)

Tabla 17 Efecto de la fuente de inóculo sobre la cinética de fermentación de tres substratos

Ítem	Tratamientos ¹				DER ²	Efecto tratamiento <i>P</i> =	Contraste ³ Control vs. (Aceite) <i>P</i> =	Contraste ⁴ Girasol vs (Pescado/Algas) <i>P</i> =
	Control	Girasol	Pescado	Algas				
Pienso del tratamiento control								
Producción asintótica de gas, mL	321	321	312	328	26,4	0,676	0,903	0,914
Ritmo de producción gas, h ⁻¹	0,050	0,049	0,055	0,051	0,0067	0,324	0,695	0,205
Tiempo de retraso, h	1,3	1,4	1,7	1,6	0,74	0,456	0,179	0,429
Producción de gas a 24 h, mL	217	215	220	221	19,9	0,936	0,955	0,537
Ritmo medio de fermentación, mL/h	10,6	10,4	10,9	10,6	1,30	0,820	0,764	0,458
Almidón								
Producción asintótica de gas, mL	414	419	400	422	44,6	0,780	0,980	0,704
Ritmo de producción gas, h ⁻¹	0,111	0,107	0,104	0,096	0,0153	0,270	0,184	0,264
Tiempo de retraso, h	2,2 ^b	3,0 ^{ab}	3,5 ^{ab}	5,1 ^a	1,45	0,012	0,016	0,061
Producción de gas a 24 h, mL	377	374	347	346	31,4	0,132	0,120	0,067
Ritmo medio de fermentación, mL/h	24,7 ^a	22,2 ^{ab}	20,1 ^b	18,1 ^b	2,96	0,006	0,003	0,035
Celulosa								
Producción asintótica de gas, mL	388	384	356	382	65,8	0,760	0,627	0,604
Ritmo de producción gas, h ⁻¹	0,046	0,048	0,051	0,047	0,0125	0,924	0,661	0,886
Tiempo de retraso, h	14,9	15,3	16,6	16,0	4,32	0,859	0,534	0,619
Producción de gas a 24 h, mL	122	122	100	112	15,8	0,753	0,590	0,432
Ritmo medio de fermentación, mL/h	6,6	6,4	5,9	6,1	1,14	0,603	0,345	0,374

¹ Control = sin grasa añadida; Girasol = adición de aceite de girasol (2 % de MS); Pescado = adición de aceite de girasol (2 % de MS) y pescado (1 % de MS);

Algas = adición de aceite de girasol (2 % of MS) y algas (1 % de MS)

² DER = desviación estándar residual

³ Comparación entre el tratamiento control y otros tratamientos (adición de aceites)

⁴ Comparación entre el tratamiento Girasol y los tratamientos que incluyen aceites marinos (Pescado o Algas) como suplemento al aceite de girasol

⁵ MOF = Materia orgánica fermentable

^{a,b,c} Dentro de una misma línea, las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos ($P < 0,05$, prueba de Tukey)

Tabla 18. Efecto de la adición al pienso de aceites de girasol, pescado o algas sobre el perfil y la biohidrogenación de ácidos grasos en la digesta ruminal

Ítem	Tratamientos ¹				DER ²	Efecto tratamiento	Contraste ³ Control vs. (Aceite)	Contraste ⁴ Girasol vs (Pescado/Algas)
	Control	Girasol	Pescado	Algas		P =	P =	P =
Ácidos grasos de la digesta (% del total AG)								
C14:0	2,01 ^b	1,92 ^b	2,53 ^{ab}	3,01 ^a	0,320	0,011	0,091	0,008
C14:1	1,41	1,34	1,16	1,35	0,332	0,940	0,622	0,840
C15:0	1,59	1,17	1,50	1,38	0,327	0,350	0,256	0,204
C15:1	0,439	0,300	0,452	0,318	0,119	0,210	0,250	0,288
C16:0	22,8 ^a	17,8 ^b	18,2 ^b	20,1 ^{ab}	1,76	0,012	0,003	0,241
C16:1	4,09 ^a	3,83 ^{ab}	4,59 ^a	3,19 ^b	0,372	0,006	0,281	0,965
Total C18 FA	62,0 ^{ab}	66,5 ^a	64,1 ^{ab}	59,1 ^b	3,10	0,041	0,535	0,029
C20:5n3	0,0	0,0	0,50	0,42	0,235	0,017	0,045	0,008
C22:6n3	0,0 ^b	0,0 ^b	1,32 ^a	1,59 ^a	0,396	< 0,001	0,002	< 0,001
Otros	6,29	6,18	7,09	6,48	1,34	0,854	0,733	0,562
Perfil de C18 (AG % del total de AG C18)								
C18:0	17,5	15,1	13,4	14,4	2,90	0,390	0,126	0,550
C18:1 t11	2,23	2,33	1,87	2,76	1,350	0,874	0,903	0,992
C18:1 c9	29,5	29,6	27,6	31,6	2,95	0,340	0,907	0,975
C18:1 c11	4,63	3,47	4,49	3,04	0,898	0,077	0,088	0,611
C18:2 c9c12	31,2	40,6	40,3	40,8	5,91	0,139	0,028	0,716
C18:3 c6c9c12	0,30	0,25	0,34	0,33	0,081	0,401	0,944	0,102
C18:3 c9c12c15	5,62 ^a	4,36 ^{ab}	5,25 ^{ab}	4,08 ^b	0,560	0,038	0,024	0,513
C18:2 c9t11	0,049 ^b	0,275 ^a	0,337 ^a	0,343 ^a	0,059	< 0,001	< 0,001	0,105
C18:2 t10c12	0,391 ^a	0,276 ^b	0,298 ^{ab}	0,291 ^{ab}	0,044	0,043	0,008	0,623
Otros	2,18	2,00	1,81	1,74	0,397	0,472	0,205	0,421
Biohidrogenación %								
C18:3 c9c12c15	52,5 ^a	34,6 ^{ab}	27,1 ^b	38,3 ^a	7,82	0,012	0,004	0,733
C18:2 c9c12	34,7 ^a	29,8 ^a	8,5 ^b	24,7 ^a	5,92	0,009	0,019	0,024
C18:1 c9	6,5 ^b	21,2 ^{ab}	27,7 ^a	13,5 ^{ab}	8,34	0,040	0,028	0,917
Total insaturados C18	27,3 ^a	21,3 ^{ab}	17,3 ^b	18,9 ^b	3,78	0,027	0,006	0,260

¹ Control = sin grasa añadida; Girasol = adición de aceite de girasol (2 % de MS); Pescado = adición de aceite de girasol (2 % de MS) y pescado (1 % de MS);

Algas = adición de aceite de girasol (2 % of MS) y algas (1 % de MS)

² DER = desviación estándar residual

³ Comparación entre el tratamiento control y otros tratamientos (adición de aceites)

⁴ Comparación entre el tratamiento Girasol y los tratamientos que incluyen aceites marinos (Pescado o Algas) como suplemento al aceite de girasol

⁵ MOF = Materia orgánica fermentable

^{a,b,c} Dentro de una misma línea, las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos ($P < 0,05$, prueba de Tukey)

Se apreciaron algunas diferencias significativas entre tratamientos en el perfil de ácidos grasos en las muestras de digesta (Tabla 18). En comparación con el tratamiento control, la concentración de C16:0 fue menor en los tratamientos Girasol y Pescado y la concentración de C16:1 fue menor en el tratamiento Algas. La concentración de ácidos grasos de 18 C fue mayor en el tratamiento Girasol y menor con el pienso Algas, con los tratamientos control y Pescado en una posición intermedia.

No se observaron diferencias entre tratamientos respecto a la proporción de C18:0, C18:1 *n*-7, C18:1 *n*-7, y C18:3 *n*-7 en relación con el total de ácidos grasos de 18 C analizados. Por el contrario, la concentración relativa de C18:2 *n*-7 fue mayor en los tratamientos con aceite (Girasol, Pescado y Algas) en comparación con el tratamiento control; mientras que la concentración de C18:3 *n*-7 fue mayor en el tratamiento control que en el tratamiento Algas, con los otros tratamientos mostrando valores intermedios.

La concentración de C18:2 *n*-7 fue mayor en los tratamientos con aceite (Girasol, Pescado y Algas) en comparación con el tratamiento control. Sin embargo, la concentración de C18:2 *n*-6 fue ligeramente mayor en el control que en el tratamiento Girasol, y los tratamientos Pescado y Algas se ubicaron en una posición intermedia.

La biohidrogenación del total de ácidos grasos insaturados de 18 C fue mayor en el control que en los tratamientos Pescado y Algas. La biohidrogenación del C18:1 *n*-7 fue mayor en el tratamiento Pescado que en el control; sin embargo, la biohidrogenación del C18:2 *n*-7 fue menor con el pienso Pescado que en los otros tratamientos. Con el tratamiento Pescado la biohidrogenación del ácido graso C18:3 *n*-7 fue menor que la estimada para los tratamientos control y Algas (Tabla 18).

4.4.4 DISCUSIÓN

4.4.4.1 Digestión del sustrato, patrón de fermentación y síntesis microbiana en el rumen

En general, la adición de los aceites (Girasol, Pescado y Algas) no tuvo un efecto negativo relevante sobre la fermentación ruminal en comparación con el pienso sin aceites añadidos (control). Con los aceites se observó una ligera disminución del pH, que resultó significativa teniendo en cuenta que en estos fermentadores RUSITEC el pH oscila dentro de un rango muy estrecho, como consecuencia de la infusión permanente de saliva artificial con bicarbonato de sodio ([McDougall, 1948](#)), un buffer con una potente capacidad amortiguadora. Además, en contra de lo que cabría esperar, con la adición de aceites se observó un aumento en la degradación de la FND. La adición de grasas a los piensos de los rumiantes tiende a reducir la digestibilidad de la fibra ([Palmquist y Jenkins, 1980](#)). En un experimento *in vitro* con una ración completa (ensilaje de maíz 39 %, heno de alfalfa 35 %, concentrado 26 %) y diferentes niveles de adición (0, 3,1 o 6,2 mL/L) de aceite de coco o aceite de pescado, [Patra y Yu \(2013\)](#) observaron una disminución en la digestibilidad de la materia seca y de la FND. En la mayoría de los estudios en los que se ha investigado este efecto, se han utilizado raciones con gramíneas forrajeras ([Kelly, 1983](#); [Horner y col., 1985](#); [Cabiddu y col., 2006](#)), cuya fibra es diferente en composición y estructura a la de los forrajes utilizados como fuente de fibra en el presente experimento, heno de alfalfa y pulpa de remolacha. Por este motivo, los efectos de los aceites sobre la cinética de fermentación de la FND pueden no coincidir con lo observado en otros estudios. En la prueba de producción de gas realizada utilizando el líquido de los fermentadores para sondear cambios en la actividad fermentativa, no se observaron cambios en la actividad celulolítica en respuesta a la adición de aceites, ya que no hubo diferencias significativas en la cinética de fermentación de la celulosa entre ninguno de los tratamientos experimentales. Tan sólo se apreciaron algunos efectos que indicaron un efecto sobre la actividad amilolítica, al observarse un efecto significativo cuando el sustrato fue almidón y se adicionó la mezcla de aceite de girasol y aceite de algas. En este caso, se observó un aumento en el tiempo de retraso y un menor ritmo medio de fermentación en

comparación con el control, con los otros dos tratamientos en una posición intermedia.

Las diferencias en el pH y en la degradación de la FND fueron coherentes con el aumento en la producción total de AGV observado con los aceites, que también fue inesperado ([Potu y col., 2011](#); [Shingfield y col., 2012](#)) y con el aumento en la concentración de lactato. Algunos estudios parecen indicar que, en condiciones *in vitro*, la suplementación con un 3 % de diferentes tipos de ácidos grasos de cadena larga puede provocar efectos en el patrón de fermentación ruminal afectando a la concentración y la composición de los ácidos grasos volátiles. Así, se ha señalado que el C18:2 c9c12c15 incrementa la fermentación microbiana y la concentración de ácidos grasos volátiles, y que existe una relación de tipo cuadrático entre la producción total de AGV y el número de dobles enlaces de los aceites adicionados ([Gao y col., 2016](#)).

En el presente trabajo se observó que en todos los tratamientos hubo una mayor producción de ácido butírico que de ácido propiónico, lo que es una característica poco habitual en la fermentación ruminal ([Russell, 2002](#)). Sin embargo, este patrón ya se ha observado con anterioridad en experimentos *in vitro* con fermentadores de flujo continuo ([Gregorini y col., 2010](#)). En cultivos no renovados en botella ([Li y col., 2015](#)), se ha advertido que la evolución de la ratio propiónico/butírico disminuía paulatinamente desde la inoculación inicial de incubación hasta las 12 h de incubación, momento en que los dos valores se hicieron prácticamente iguales. La predominancia del ácido butírico sobre el propiónico puede deberse a las características de la dieta. En este sentido, en condiciones *in sacco*, ([Huhtanen, 1988](#)) registró una producción de butírico mayor a la de propiónico con una dieta basada en ensilaje de gramínea (48 % de la MS) suplementada con cebada, pero no con pulpa de remolacha. Sin embargo, en corderos en fase de crecimiento explotados en condiciones intensivas no se observaron diferencias en la concentración de butirato ruminal entre los animales alimentados con un concentrado que tenía 50 % de cebada y aquellos en los que se reemplazó el 24 % de la cebada por pulpa de remolacha ([Bodas y col., 2007](#)). Por esta razón, parece que otro tipo de factores diferentes podrían haber inducido esta modificación en nuestro estudio.

En este sentido, también se ha descrito que el predominio del butirato sobre el propionato puede ser inducido por la suplementación lipídica y que responde a características muy precisas del perfil de ácidos grasos suministrado. Así, [Palmquist y Griinari \(2006\)](#) observaron que con una ración a base de heno de leguminosa (60 %) y concentrado (40 %) suplementada con una mezcla de aceite de girasol (2 %) y aceite de pescado (1 %), la producción de ácido butírico en el rumen superó a la de propiónico. Sin embargo, ese efecto no se observó al suplementar solo con aceite de pescado (3 %) o con una mezcla de girasol al 1 % y aceite de pescado al 2 %. En el presente estudio, la suplementación con un 2 % de aceite de girasol y un 1 % de aceite de pescado fue similar a la descrita en el estudio anterior, y de igual modo observamos un predominio del butirato sobre el propionato, aunque esto también se presentó en la mezcla con aceite de algas, e incluso con la suplementación con solo aceite de girasol (2 % de MS).

La ratio acetato:propionato en la digesta ruminal suele disminuir con dietas altas en concentrado, al aumentar la proporción molar de propionato y disminuir la de acetato. No obstante *in vitro* se ha observado que dicha ratio varía de forma importante a lo largo del tiempo de incubación. Así, por ejemplo, [Wang y col. \(2003\)](#) registraron una amplia fluctuación de la ratio acetato:propionato en el líquido ruminal al incubar dietas altas en concentrado (70 y 85 % de la dieta), comprendida entre 1,0 y 2,0 a las 2 y a las 9 h de incubación, respectivamente. No obstante, también se ha observado que la suplementación con aceite de coco cambió la ratio acetato:propionato, aunque el mismo nivel de suplementación con aceite de pescado no la afectó ([Patra y Yu, 2013](#)). Por otra parte, en fermentadores de flujo continuo se observó que la adición de aceite de pescado (3 % de MS) aumentaba la concentración de propionato, valerato, isobutirato e isovalerato respecto a la dieta control sin aceite y a las dietas suplementadas con grasa animal o aceite de soja ([Potu y col., 2011](#)). Sin embargo, en condiciones *in vivo* la suplementación con niveles crecientes de aceite de pescado (0, 75, 150 y 300 g/día) incrementó progresivamente la proporción molar de propionato y butirato, y disminuyó la de acetato ([Shingfield y col., 2012](#)). En el presente trabajo se observó que con la adición de los aceites disminuyó la ratio acetato:propionato, al mismo tiempo que aumentó la concentración de lactato. La alteración del patrón de fermentación es consecuencia del efecto de la dieta y/o de la suplementación

lipídica sobre las poblaciones bacterianas, ya que estos factores estimulan unos grupos de bacterias e inhiben la proliferación de otras especies, tal y como se indica en un ensayo con niveles crecientes de aceite de pescado que no alteró significativamente la proporción de propionato o butirato, pero sí que provocó cambios en la biohidrogenación de ácidos grasos (disminuyó la concentración de C18:0 y aumentó la concentración de C18:1 *t*10 y C18:1 *t*11) al mismo tiempo que redujo la abundancia de diversas especies del género *Butyrivibrio* spp. ([AbuGhazaleh y Ishlak, 2014](#)).

Como se mencionó anteriormente, no se observaron efectos negativos de la suplementación lipídica sobre la fermentación; lo que concuerda con la falta de efecto sobre las variables de metabolismo nitrogenado en el rumen. La adición de aceites no afectó a la digestibilidad de la proteína, ni a la concentración de amoníaco, ni a la producción de proteína microbiana. Otros estudios con el sistema RUSITEC y usando diferentes aceites como suplemento a la ración basal han observado resultados similares. La inclusión de aceites de linaza, colza y pescado (5 % de la MS) en una dieta con alfalfa (100 %) no alteró la eficiencia de síntesis de la proteína microbiana ni la digestibilidad de la MS o de la FND ([Jalč y col., 2006](#)). La eficiencia de síntesis de proteína microbiana en el rumen tampoco se vio afectada con una dieta con un 60 % de alfalfa y un 40 % de maíz suplementada con los mismos aceites en la misma concentración ([Jalc y col., 2006c](#)). No obstante, en el caso de animales canulados en el rumen, la suplementación (6 % de la MS) con semilla de linaza, aceite de pescado y mezcla de semilla de linaza y aceite de pescado de una dieta basada en gramíneas forrajeras (71 a 74 %), disminuyó la eficiencia y la síntesis de proteína microbiana ([Wachira y col., 2000](#))

Sin embargo, cuando en el sistema RUSITEC se incubó una ración con un alto contenido en maíz (60 %), los tres aceites (linaza, colza y pescado al 5 % de la MS) disminuyeron la eficiencia de síntesis de proteína bacteriana, pero no afectaron la degradación de la MS o de la FND, aunque sí la de celulosa ([Jalc y col., 2006b](#)). La disminución de la eficiencia de síntesis bacteriana también se presentó cuando esta última dieta se suplementó con una mezcla de aceites: linaza-colza, linaza-pescado o linaza-colza-pescado (5 % de la MS) ([Jalc y col., 2006d](#)). No obstante, hay que resaltar que el efecto de los aceites sobre las

probiotas bacterianas depende de la concentración de aceites utilizada ([Maia y col., 2010](#)), y la máxima concentración de aceites usado en nuestro estudio fue solo un 3 % de la MS.

También se ha observado que la suplementación con aceites puede incluso aumentar la eficiencia de síntesis bacteriana ([Sinclair y col., 2005](#)). Utilizando animales fistulados en el rumen, ([Broudiscou y col., 1994](#)) observaron que la suplementación con aceite de lino (6 % de la MS) aumentó dicha eficiencia; resultado que también se apreció como consecuencia de la defaunación en animales sin suplementación lipídica. En el mismo sentido, [Doreau y Ferlay \(1995\)](#) analizaron el efecto de la suplementación lipídica sobre la concentración de amoníaco y la eficiencia de síntesis microbiana y concluyeron que el efecto es mínimo, y normalmente asociado a cambios en la degradación de la materia orgánica y en la población de protozoarios ruminales. [Oldick y Firkins \(2000\)](#) también señalaron que el aumento en la eficiencia de síntesis de proteína microbiana está mediado por una disminución en la población de protozoos que se produce como consecuencia de la adición de la grasa.

Aunque se ha documentado el efecto de la suplementación lipídica sobre la eficiencia de síntesis microbiana, también se ha demostrado que la naturaleza de la dieta puede ser determinante. Así, [Huws y col. \(2010\)](#) observaron que las comunidades bacterianas asociadas a la fase líquida y a la fase sólida eran afectadas en mayor medida por la dieta (forraje vs. ensilaje de trébol) que por la adición de aceite de pescado (hasta un 3 % de la MS).

4.4.4.2 Producción de gas de fermentación y metano

Con respecto a la producción de metano, se ha documentado que la adición de aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados puede disminuir su producción ([Beauchemin y col., 2007](#); [Hristov y col., 2013](#)). La reducción en la formación de metano puede deberse a la utilización de hidrógeno liberado en la fermentación ruminal para la biohidrogenación de los ácidos grasos, desviándolo así de su uso para la metanogénesis. No obstante, se ha considerado que se debe, fundamentalmente, a los efectos tóxicos de los ácidos grasos sobre los microorganismos del rumen ([Giger-Reverdin y col., 2003](#)). Tal y como se ha observado en el presente trabajo, dicho efecto es más acentuado a medida que

aumenta con el grado de insaturación de los ácidos grasos en los aceites que se añaden al pienso. Así, se ha visto que el efecto del aceite de lino es mayor que el del aceite de girasol ([Castagnino y col., 2015](#)). Y se ha reconocido un alto potencial para reducir el metano con el aceite de pescado ([Fievez y col., 2003](#)) y con el aceite de algas ([Fievez y col., 2007](#)). En el presente trabajo se observó la mayor reducción de metano con las mezclas de aceite de girasol tanto con aceite de pescado como con aceite de algas, y con el aceite de girasol la producción de metano fue intermedia entre los tratamientos anteriores y el control. La disminución en la producción de metano estuvo acompañada de una disminución de la ratio acético:propiónico. Estos resultados coinciden con lo descrito en otro trabajo con aceite de pescado en RUSITEC ([Jalc y col., 2006a](#)), aunque en este último estudio la ración estuvo compuesta por forrajes. No obstante, usando este mismo sistema de simulación *in vitro* de la fermentación ruminal (RUSITEC), [Szczechowiak y col. \(2016\)](#) no observaron un efecto de la adición de una mezcla de aceite de girasol y aceite de pescado sobre la producción de metano; si bien hay que considerar que ese estudio se realizó con un sustrato de fermentación diferente, que incluyó ensilaje de maíz, ensilaje de gramíneas y destilados de cervecería, y que no incluyó heno de alfalfa ni pulpa de remolacha. En el presente trabajo la suplementación del pienso con aceites de pescado o algas hizo que la producción diaria de metano se redujese hasta un 22 % con respecto al valor observado con el pienso control. Esta reducción es inferior al 80 % registrado en otros experimentos *in vitro* ([Fievez y col., 2003](#)) con cultivos no renovados de microorganismos ruminales, en los que se utilizaron ácidos grasos poliinsaturados no esterificados. Cuando los ácidos grasos se aportan esterificados, la lipólisis (hidrólisis de los triglicéridos) determina la concentración de ácidos grasos de cadena larga no esterificados y su efecto sobre las comunidades microbianas productoras de metano.

4.4.4.3 Perfil y biohidrogenación de los ácidos grasos de cadena larga

Normalmente, como consecuencia de la administración de aceites ricos en ácidos grasos insaturados, como el linoleico (presente en el aceite de girasol), aumenta la concentración de C18:1 *n*-7 ([Hervás y col., 2006](#); [AbuGhazaleh y Jacobson, 2007](#); [Gomez-Cortes y col., 2008](#); [Luna y col., 2008](#); [Wu y col., 2013](#)). Este efecto sobre el C18:1 *n*-7 es aún mayor cuando, además de tener una dieta

con altos niveles de ácido linoleico, se adiciona aceite de pescado ([Duckett y Gillis, 2010](#); [Toral y col., 2010](#); [Hou y col., 2011](#); [Li y col., 2011](#); [Shingfield y col., 2012](#)) o aceite de algas ([Reynolds y col., 2006](#); [Boeckaert y col., 2007](#); [AbuGhazaleh y col., 2009](#)), que inhiben la biohidrogenación del C18:1 *t*11 causando su acumulación y produciendo de forma concurrente una disminución del C18:0 ([Shingfield y col., 2003](#); [Lee y col., 2005](#)). Sin embargo, también está documentado que la producción de C18:1 *t*11 puede ser mayor con la adición de aceite de soja que con la de aceite de pescado ([Potu y col., 2011](#)). En el presente estudio no se observaron diferencias en la concentración de los dos ácidos grasos referidos (C18:1 *t*11 y C18:0 como intermediario y producto final, respectivamente, de la biohidrogenación de los ácidos grasos poliinsaturados de 18 C) entre el control y los tratamientos con aceite de girasol, y los tratamientos en los que, además, el pienso se suplementó con aceite de pescado o aceite de algas marinas.

No obstante, también se observó que al incubar el pienso control la concentración de C18:2 *t*10*c*12 fue 8 veces mayor que la de C18:2 *c*9*t*11. El aumento de C18:2 *t*10*c*12 ha sido observado con dieta altas en concentrado y almidones ([Lor y col., 2005](#); [Chilliard y col., 2007](#); [Fuentes y col., 2009](#); [Zened y col., 2013](#)) y se ha relacionado con el síndrome de baja grasa en la leche ([Bauman y Griinari, 2001](#)). La relación entre isómeros conjugados del C18:2 en el rumen puede presentar diferencias significativas como consecuencia del tipo de dieta utilizada, ya que este factor afecta a parámetros de la fermentación tales como, por ejemplo, el pH, la presión osmótica o el contenido ruminal, entre otros ([Wang y Lee, 2015](#)). Dado que en la vía de hidrogenación que desde el C18:2 *t*10*c*12 conduce al C18:0 se produce el isómero C18:1 *t*10 ([Wallace y col., 2007](#)), es razonable pensar que en el presente estudio, debido al pienso control utilizado (con una alta proporción de concentrado) y a las condiciones de fermentación prevalentes en los fermentadores, la concentración de C18:1 *t*10 pudo haber superado a la concentración de C18:1 *t*11. Sin embargo, el ácido graso C18:1 *t*10 no está presente en el FAMEMIX que se utilizó como estándar para el análisis cromatográfico, por lo que no se determinó su concentración relativa en la digesta.

Se observó que en los tratamientos con aceite (Girasol, Pescado o Algas) aumentó la concentración C18:2 *c9t11* (entre 5 y 7 veces) en comparación con el control; efecto atribuible al aceite de girasol que estaba presente en los tres tratamientos antes referidos ([Buccioni y col., 2006](#)). De manera simultánea, en estos tres tratamientos se observó un aumento del nivel de su precursor, el C18:2 *t10c12*. Además, también se observó una disminución en la concentración de C18:2 *t10c12* con los tres piensos suplementados con aceite (Girasol, Pescado o Algas). Este efecto de los aceites (disminución de C18:2 *t10c12* y aumento de C18:2 *c9t11*) también fue registrado por [Zened y col. \(2013\)](#) en el rumen de bovinos cuando se adicionó aceite de girasol (4,8 %) a una dieta de ensilaje de maíz (63 %), heno de alfalfa (14 %) y harina de soja (16 %), pero no cuando la dieta era rica en cereales con alto contenido en almidón, con ensilaje de maíz (32 %), trigo-cebada (48 %) y harina de soja (13 %), donde se observó el efecto contrario, aumento de C18:2 *t10c12* y disminución de C18:2 *c9t11*.

Por todo ello, parece evidente que el proceso de biohidrogenación depende de forma importante de las características y composición de la ración. En este estudio, el pienso tiene un alto contenido de carbohidratos rápidamente fermentables (25 % maíz, 15 % de cebada y 5,5 % de melaza) y un contenido medio en fibra (aportado por el 20 % de heno de alfalfa y el 10 % de pulpa de remolacha). Esta composición específica afecta también al efecto que sobre el perfil de ácidos grasos en la digesta pueda tener la suplementación con acetite de girasol o de aceites de origen marino. Es probable que, con otra dieta, los efectos de la suplementación lipídica sobre la biohidrogenación se hubiesen intensificado. Por otra parte, la determinación de algunos isómeros C18:2 y C18:1 intermediarios en la biohidrogenación de ácidos grasos de 18 C hasta C18:0 hubiese facilitado la interpretación de los resultados. La suplementación con aceite de pescado no sólo afecta a la producción de C18:1 *t11*, sino que, además, puede provocar cambios en las vías de biohidrogenación, en un sentido o en otro dependiendo del tipo de ración sobre el que se añade dicho aceite. [AbuGhazaleh y Ishlak \(2014\)](#) observaron que niveles crecientes de aceite de pescado (0,5, 2 y 3,5 % de la materia seca) añadidos a cultivos *in vitro* provocaban un aumento lineal de los niveles de C18:1 *t11* y de C18:1 *t10*. También se ha observado un aumento de C18:2 *t10c12* (un 38 % más alto) en la leche en respuesta a la

suplementación con aceite de pescado ([Cieślak y col., 2015](#)). De hecho, el aceite de pescado se ha usado para inducir el síndrome de baja grasa en la leche de vacas, efecto que se atribuye al aumento en los niveles de ácidos grasos *trans* diferentes al C18:1 *t*11 y al C18:2 *c*9*t*11. Así, [Gama y col. \(2008\)](#) adicionaron aceite de pescado a la dieta y encontraron que los niveles de C18:2 *t*9*c*11 explicaban más del 80 % de la presentación del síndrome y que su concentración estaba estrechamente correlacionada con la del C18:1 *t*10. Sin embargo, también se ha evidenciado que el efecto de la adición de aceite de pescado cambia con la dosis. [Palmquist y Griinari \(2006\)](#) adicionaron un 3 % de una mezcla de aceite girasol y diferentes niveles de aceite de pescado (hasta un 1 %), y apreciaron una concentración más elevada de C18:1 *t*11 y de C18:2 *c*9*t*11 con los niveles intermedios de aceite de pescado.

Con respecto al aceite de algas, se ha observado que la suplementación (9,4 g/kg de MS) inhibe la biohidrogenación del C18:2 *c*9*c*12 y del C18:3 *c*9*c*12*c*15 y aumenta las concentraciones de C18:1 *t*11 y C18:1 *t*10, hasta 6 y 20 veces en comparación con el pienso no suplementado, respectivamente ([Boeckert y col., 2008](#)). De igual forma con la adición de ácido docosaheptaenoico (C22:6 *n*3), ácido graso abundante en las algas, se observa una mayor cantidad de C18:3 *c*9*c*12*c*15 y C18:2 *t*11*c*15 y una reducción de la hidrogenación de C18:1 *t*11 a C18:0 ([Vlaeminck y col. \(2008\)](#)).

La falta de respuesta a la suplementación con aceites marinos en los niveles de C18:1 *t*11 y C18:2 *c*9*t*11 también puede estar relacionada con las características de la dieta usada, rica en almidones. [Torral y col. \(2014\)](#) observaron una menor respuesta en C18:1 *t*11 y C18:2 *c*9*t*11 a la suplementación con aceite de pescado (40 g/d) en dietas ricas en maíz (24 %) que en dietas con un mayor contenido en cebada (31 %), al mismo tiempo que no se vio afectada la concentración de C18:1 *t*10 de la leche, lo que indicaría que en la dieta con maíz hay una menor inhibición de la hidrogenación del C18:1 *t*11. En la dieta utilizada en el presente trabajo predominaba el maíz (25 %) sobre la cebada (15 %). Además, las condiciones de fermentación dentro del sistema RUSITEC se pueden alterar cuando las raciones tienen una baja proporción de forraje ([Carro y col., 2009](#)), y eventualmente se pudo haber modificado las poblaciones bacterianas responsables de la lipólisis, isomerización y/o hidrogenación de los ácidos grasos.

No obstante, [Szczechowiak y col. \(2016\)](#) en experimentos con fermentadores RUSITEC, observaron que, con una dieta rica en cereales y sin heno, la suplementación con una mezcla de aceites de pescado y soja (3 % de MS) aumentaba la concentración de C18:1 *n*-7, C18:1 *n*-7 y C18:2 *n*-7 $\rightarrow$ 8 en el líquido de las vasijas; pero no tuvo efectos sobre C18:0, C18:2 *n*-7 $\rightarrow$ 11 ni C18:2 *n*-10 $\rightarrow$ 12, lo que parece indicar un efecto de la suplementación con aceites marinos relacionado con el tipo de pienso utilizado y con el sistema de fermentación. A pesar de dichos cambios en la digesta ruminal, en un experimento posterior no se apreciaron efectos sobre el perfil de ácidos grasos en la leche de vacas que recibieron la suplementación lipídica.

4.4.5 CONCLUSIONES

La adición de un 1 % de aceite de pescado o de algas a un pienso de ovejas lecheras ya suplementado con un 2 % de aceite de girasol no afecta a la digestibilidad del alimento, pero reduce significativamente la producción de metano al ser fermentado en el rumen. Además, se producen cambios en el patrón de fermentación ruminal, observándose una disminución de la ratio acetato:propionato y una mayor producción total de ácidos grasos volátiles y de ácido láctico, sin afectar a la síntesis de la proteína microbiana. La adición de estos aceites no afecta a la actividad celulolítica en los fermentadores, observándose tan solo una pequeña disminución del ritmo de fermentación del almidón. La adición de aceites de pescado o algas, junto con aceite de girasol, al pienso disminuye la hidrogenación de los ácidos grasos de cadena larga en el rumen, con un efecto diferente sobre la saturación de cada ácido graso. De esta forma, se producen variaciones en el perfil de ácidos grasos de la digesta en respuesta a la adición de los aceites de pescado o algas, entre las que cabe destacar un aumento en la proporción relativa de ácido linoleico conjugado (C18:2 *n*-7 $\rightarrow$ 11).

4.4.6 BIBLIOGRAFIA

- AbuGhazaleh, A., and Ishlak, A. (2014). Effects of incremental amounts of fish oil on trans fatty acids and Butyrivibrio bacteria in continuous culture fermenters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98, 271-278.
- AbuGhazaleh, A. A., and Jacobson, B. N. (2007). Production of trans C18:1 and conjugated linoleic acid in continuous culture fermenters fed diets containing fish oil and sunflower oil with decreasing levels of forage. *Animal*, 1, 660-665.
- AbuGhazaleh, A. A., and Jenkins, T. C. (2004). Short communication: Docosaehaenoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. *Journal of Dairy Science*, 87, 1047-1050.
- AbuGhazaleh, A. A., Potu, R. B., and Ibrahim, S. (2009). Short communication: The effect of substituting fish oil in dairy cow diets with docosaehaenoic acid-micro algae on milk composition and fatty acids profile. *Journal of Dairy Science*, 92, 6156-6159.
- AOAC. (1999). *Official methods of analysis* (16th ed.). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- AOCS. (2008). *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society* (5th ed.). Urbana, IL. U.S.A: AOCS
- Bauman, D. E., and Griinari, J. M. (2001). Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science*, 70, 15-29.
- Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., and Petit, H. V. (2007). Methane abatement strategies for cattle: Lipid supplementation of diets. *Canadian Journal of Animal Science*, 87, 431-440.
- Bernard, L., Toral, P., Rouel, J., and Chilliard, Y. (2016). Effects of extruded linseed and level and type of starchy concentrate in a diet containing fish oil on dairy goat performance and milk fatty acid composition. *Animal Feed Science and Technology*, 222, 31-42.
- Bodas, R., Giráldez, F. J., López, S., Rodríguez, A. B., and Mantecón, A. (2007). Inclusion of sugar beet pulp in cereal-based diets for fattening lambs. *Small Ruminant Research*, 71, 250-254.
- Boeckaert, C., Fievez, V., Hecke, D. V., Verstraete, W., and Boon, N. (2007). Changes in rumen biohydrogenation intermediates and ciliate protozoa diversity after algae supplementation to dairy cattle. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 767-777.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Fievez, V., Maignien, L., Dijkstra, J., and Boon, N. (2008). Accumulation of trans C-18:1 fatty acids in the rumen after dietary algal supplementation is associated with changes in the Butyrivibrio community. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 6923-6930.
- Broudiscou, L., Pochet, S., and Poncet, C. (1994). Effect of linseed oil supplementation on feed degradation and microbial synthesis in the rumen of ciliate-free and refaunated sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 49, 189-202.
- Buccioni, A., Antongiovanni, M., Petacchi, F., Mele, M., Serra, A., Secchiari, P., and Benvenuti, D. (2006). Effect of dietary fat quality on C18:1 fatty acids and conjugated linoleic acid production: An *in vitro* rumen fermentation study. *Animal Feed Science and Technology*, 127, 268-282.

- Cabiddu, A., Addis, M., Pinna, G., Decandia, M., Sitzia, M., Piredda, G., Pirisi, A., and Molle, G. (2006). Effect of corn and beet pulp based concentrates on sheep milk and cheese fatty acid composition when fed Mediterranean fresh forages with particular reference to conjugated linoleic acid cis-9, trans-11. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 292-311.
- Carro, M. D., and Miller, E. L. (1999). Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semi-continuous culture system (RUSITEC). *British Journal of Nutrition*, 82, 149-157.
- Carro, M. D., Ranilla, M. J., Martín-García, A. I., and Molina-Alcaide, E. (2009). Comparison of microbial fermentation of high- and low-forage diets in RUSITEC, single-flow continuous-culture fermenters and sheep rumen. *Animal*, 3, 527-534.
- Castagnino, P. d. S., Messana, J. D., Fiorentini, G., De Jesus, R., San Vito, E., Carvalho, I., and Berchielli, T. (2015). Glycerol combined with oils did not limit biohydrogenation of unsaturated fatty acid but reduced methane production *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 201, 14-24.
- Chilliard, Y., and Ferlay, A. (2004). Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Development*, 44, 467-492.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., and Doreau, M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 828-855.
- Cieślak, A., El-Sherbiny, M., Szczechowiak, D. K., Kowalczyk, D., Pers-Kamczyc, E., Bryszak, M., Szulc, P., Jóźwik, A., and Szumacher-Strabel, M. (2015). Rapeseed and fish oil mixtures supplied at low dose can modulate milk fatty acid composition without affecting rumen fermentation and productive parameters in dairy cows. *Animal Science Papers and Reports*, 33, 357-372.
- Czerkawski, J. W., and Breckenridge, G. (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (RUSITEC). *British Journal of Nutrition*, 38, 371-384.
- Doreau, M., and Ferlay, A. (1995). Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: A review. *Livestock Production Science*, 43, 97-110.
- Duckett, S. K., and Gillis, M. H. (2010). Effects of oil source and fish oil addition on ruminal biohydrogenation of fatty acids and conjugated linoleic acid formation in beef steers fed finishing diets. *Journal of Animal Science*, 88, 2684-2691.
- Fievez, V., Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Mestdagh, J., and Demeyer, D. (2007). *In vitro* examination of DHA-edible micro-algae: 2. Effect on rumen methane production and apparent degradability of hay. *Animal Feed Science and Technology*, 136, 80-95.
- Fievez, V., Dohme, F., Danneels, M., Raes, K., and Demeyer, D. (2003). Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. *Animal Feed Science and Technology*, 104, 41-58.
- France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M., Lopez, S., and Bannink, A. (2000). Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: Derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal of Nutrition*, 83, 143-150.

- Fuentes, M. C., Calsamiglia, S., Cardozo, P. W., and Vlaeminck, B. (2009). Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 92, 4456-4466.
- Gama, M. A. S., Garnsworthy, P. C., Griinari, J. M., Leme, P. R., Rodrigues, P. H. M., Souza, L. W. O., and Lanna, D. P. D. (2008). Diet-induced milk fat depression: Association with changes in milk fatty acid composition and fluidity of milk fat. *Livestock Science*, 115, 319-331.
- Gao, J., Wang, M., Jing, Y., Sun, X., Wu, T., and Shi, L. (2016). Impacts of the unsaturation degree of long-chain fatty acids on the volatile fatty acid profiles of rumen microbial fermentation in goats *in vitro*. *Journal of Integrative Agriculture*, 15, 2827-2833.
- Giger-Reverdin, S., Morand-Fehr, P., and Tran, G. (2003). Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle. *Livestock Production Science*, 82, 73-79.
- Gomez-Cortes, P., Frutos, P., Mantecon, A. R., Juarez, M., de la Fuente, M. A., and Hervás, G. (2008). Milk production, conjugated linoleic acid content, and *in vitro* ruminal fermentation in response to high levels of soybean oil in dairy ewe diet. *Journal of Dairy Science*, 91, 1560-1569.
- Gregorini, P., Soder, K., and Waghorn, G. (2010). Effects of timing of corn silage supplementation on digestion, fermentation pattern, and nutrient flow during continuous culture fermentation of a short and intensive orchardgrass meal. *Journal of Dairy Science*, 93, 3722-3729.
- Hervás, G., Luna, P., Mantecon, A. R., Castañares, N., Frutos, P., de la Fuente, M. A., and Juárez, M. (2006, 1 - 4 October). *Effect of sunflower oil on sheep milk production and composition, and in vitro rumen fermentation*. Paper presented at the 4th Euro Fed Lipid Congress; Fats, Oils and Lipids for a Healthier Future - Workshop on "Biohydrogenation", University of Madrid (UCM), Spain.
- Horner, J. L., Bush, L. J., Adams, G. D., and Taliaferro, C. M. (1985). Comparative nutritional value of eastern gamagrass and alfalfa hay for dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 68, 2615-2620.
- Hou, J., Wang, F., and Ren, D. (2011). Effect of the supplementation of fish oil on the conjugated linoleic acid production, especially accumulation of trans-11 C18:1 and trans-10 C18:1 fatty acids: An *in vitro* rumen fermentation study. *Small Ruminant Research*, 99, 148-152.
- Hristov, A., Oh, J., Firkins, J., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H., Adesogan, A., Yang, W., and Lee, C. (2013). Special topics—mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science*, 91, 5045-5069.
- Huhtanen, P. (1988). The effects of barley, unmolassed sugar-beet pulp and molasses supplements on organic matter, nitrogen and fibre digestion in the rumen of cattle given a silage diet. *Animal Feed Science and Technology*, 20, 259-278.
- Huws, S. A., Lee, M. R. F., Muetzel, S. M., Scott, M. B., Wallace, R. J., and Scollan, N. D. (2010). Forage type and fish oil cause shifts in rumen bacterial diversity. *FEMS Microbiology Ecology*, 73, 396-407.

- Jacob, A. B., Balakrishnan, V., and Kathirvelan, C. (2012). Effect of amount and source of vegetable oils in a high fibrous cattle diet on *in vitro* rumen fermentation, nutrient degradability and rumen cis-9, trans-11 CLA concentration. *Journal of Applied Animal Research*, 40, 148-153.
- Jalc, D., Cieslak, A., Szumacher-Strabel, M., Potkanski, A., and Kowalczyk, J. (2006a). The effect of different oils and diets on methane release in an artificial rumen (RUSITEC). *Journal of Animal and Feed Sciences*, 15, 149-152.
- Jalc, D., Potkanski, A., Szumacher-Strabel, M., Kowalczyk, J., and Cieslak, A. (2006b). The effect of a high concentrate diet and different fat sources on rumen fermentation *in vitro*. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 15, 137-140.
- Jalc, D., Potkanski, A., Szumacher-Strabel, M., Kowalczyk, J., and Cieslak, A. (2006c). The effect of a high forage diet and different fat sources on rumen fermentation *in vitro*. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 15, 133-136.
- Jalc, D., Potkanski, A., Szumacher-Strabel, M., Kowalczyk, J., and Cieslak, A. (2006d). The effect of a high forage diet and different oil blends on rumen fermentation *in vitro*. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 15, 141-144.
- Jalč, D., Potkański, A., Szumacher-Strabel, M., Kowalczyk, J., and Cieślak, A. (2006). The effect of a forage diet and different fat sources on rumen fermentation *in vitro*. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 15, 129-134.
- Kelly, P. (1983). Sugar beet pulp — A review. *Animal Feed Science and Technology*, 8, 1-18.
- Khanal, R. C., and Olson, K. C. (2004). Factors affecting conjugated linoleic acid (CLA) content in milk, meat, and egg: A review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3, 82-98.
- Lee, M. R. F., Tweed, J. K. S., Moloney, A. P., and Scollan, N. D. (2005). The effects of fish oil supplementation on rumen metabolism and the biohydrogenation of unsaturated fatty acids in beef steers given diets containing sunflower oil. *Animal Science*, 80, 361-367.
- Li, X. Z., Gao, Q. S., Yan, C. G., Choi, S. H., Shin, J. S., and Song, M. K. (2015). Conjugated fatty acids and methane production by rumen microbes when incubated with linseed oil alone or mixed with fish oil and/or malate. *Animal Science Journal*.
- Li, X. Z., Long, R. J., Yan, C. G., Lee, H. G., Kim, Y. J., and Song, M. K. (2011). Rumen microbial response in production of CLA and methane to safflower oil in association with fish oil or/and fumarate. *Animal Science Journal*, 82, 441-450.
- Loor, J. J., Ferlay, A., Ollier, A., Ueda, K., Doreau, M., and Chilliard, Y. (2005). High-concentrate diets and polyunsaturated oils alter trans and conjugated isomers in bovine rumen, blood, and milk. *Journal of Dairy Science*, 88, 3986-3999.
- Luna, P., Bach, A., Juárez, M., and de la Fuente, M. A. (2008). Influence of diets rich in flax seed and sunflower oil on the fatty acid composition of ewes' milk fat especially on the level of conjugated linoleic acid, n-3 and n-6 fatty acids. *International Dairy Journal*, 18, 99-107.

- Maia, M. R., Chaudhary, L. C., Bestwick, C. S., Richardson, A. J., McKain, N., Larson, T. R., Graham, I. A., and Wallace, R. J. (2010). Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiology*, 10(1), 52. Retrieve from Doi:10.1186/1471-2180-10-52
- McDougall, E. I. (1948). Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheeps saliva. *Biochemical Journal*, 43, 99-109.
- Oldick, B., and Firkins, J. (2000). Effects of degree of fat saturation on fiber digestion and microbial protein synthesis when diets are fed twelve times daily. *Journal of Animal Science*, 78, 2412-2420.
- Palmquist, D. L. (2007). Biohydrogenation then and now. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 737-739.
- Palmquist, D. L., and Griinari, J. M. (2006). Milk fatty acid composition in response to reciprocal combinations of sunflower and fish oils in the diet. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 358-369.
- Palmquist, D. L., and Jenkins, T. C. (1980). Fat in lactation rations: Review. *Journal of Dairy Science*, 63, 1-14.
- Patra, A. K., and Yu, Z. (2013). Effects of coconut and fish oils on ruminal methanogenesis, fermentation, and abundance and diversity of microbial populations *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 96, 1782-1792.
- Potu, R. B., AbuGhazaleh, A. A., Hastings, D., Jones, K., and Ibrahim, S. A. (2011). The effect of lipid supplements on ruminal bacteria in continuous culture fermenters varies with the fatty acid composition. *The Journal of Microbiology*, 49, 216-223.
- Reynolds, C. K., Cannon, V. L., and Loerch, S. C. (2006). Effects of forage source and supplementation with soybean and marine algal oil on milk fatty acid composition of ewes. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 333-357.
- Russell, J. B. (2002). *Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition*. Ithaca, N.Y: Cornell University.
- SAS. (2002). *User's guide: Statistics (release 8.02)*. Cary, NC, USA: SAS Inst., Inc.
- Shingfield, K. J., Ahvenjarvi, S., Toivonen, V., Arola, A., Nurmela, K. V. V., Huhtanen, P., and Griinari, J. M. (2003). Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Animal Science*, 77, 165-179.
- Shingfield, K. J., and Griinari, J. M. (2007). Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 799-816.
- Shingfield, K. J., Kairenius, P., Ärölä, A., Paillard, D., Muetzel, S., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Toivonen, V., and Griinari, J. M. (2012). Dietary fish oil supplements modify ruminal biohydrogenation, alter the flow of fatty acids at the omasum, and induce changes in the ruminal *Butyrivibrio* population in lactating cows. *The Journal of Nutrition*, 142, 1437-1448.
- Sinclair, L. A., Cooper, S. L., Chikunya, S., Wilkinson, R. G., Hallett, K. G., Enser, M., and Wood, J. D. (2005). Biohydrogenation of n-3 polyunsaturated fatty acids in the rumen and their effects on microbial metabolism and plasma fatty acid concentrations in sheep. *Animal Science*, 81, 239-248.
- Steel, R. G. D., and Torrie, J. H. (1981). *Principles and procedures of statistics: A biometrical approach* (2nd ed.). New York: McGraw-Hill.

- Szczechowiak, J., Szumacher-Strabel, M., El-Sherbiny, M., Pers-Kamczyc, E., Pawlak, P., and Cieslak, A. (2016). Rumen fermentation, methane concentration and fatty acid proportion in the rumen and milk of dairy cows fed condensed tannin and/or fish-soybean oils blend. *Animal Feed Science and Technology*, 216, 93-107.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., and France, J. (1994). A simple gas-production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48, 185-197.
- Toral, P. G., Rouel, J., Bernard, L., and Chilliard, Y. (2014). Interaction between fish oil and plant oils or starchy concentrates in the diet: Effects on dairy performance and milk fatty acid composition in goats. *Animal Feed Science and Technology*, 198, 67-82.
- Toral, P. G., Shingfield, K. J., Hervás, G., Toivonen, V., and Frutos, P. (2010). Effect of fish oil and sunflower oil on rumen fermentation characteristics and fatty acid composition of digesta in ewes fed a high concentrate diet. *Journal of Dairy Science*, 93, 4804-4817.
- Vahmani, P., Fredeen, A. H., and Glover, K. E. (2013). Effect of supplementation with fish oil or microalgae on fatty acid composition of milk from cows managed in confinement or pasture systems. *Journal of Dairy Science*, 96, 6660-6670.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., and Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.
- Vlaeminck, B., Mengistu, G., Fievez, V., de Jonge, L., and Dijkstra, J. (2008). Effect of *in vitro* docosahexaenoic acid supplementation to marine algae-adapted and unadapted rumen inoculum on the biohydrogenation of unsaturated fatty acids in freeze-dried grass. *Journal of Dairy Science*, 91, 1122-1132.
- Wachira, A. M., Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G., Hallett, K., Enser, M., and Wood, J. D. (2000). Rumen biohydrogenation of n-3 polyunsaturated fatty acids and their effects on microbial efficiency and nutrient digestibility in sheep. *Journal of Agricultural Science*, 135, 419-428.
- Wallace, R. J., McKain, N., Shingfield, K. J., and Devillard, E. (2007). Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *Journal of Lipid Research*, 48, 2247-2254.
- Wang, J. H., Choi, S. H., and Song, M. K. (2003). Effects of concentrate to roughage ratio on the formation of cis-9, trans-11 CLA and trans-11-octadecenoic acid in rumen fluid and plasma of sheep when fed high oleic or high linoleic acid oils. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16, 1604-1609.
- Wang, T., and Lee, H. G. (2015). Advances in research on cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid: A major functional conjugated linoleic acid isomer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 720-731.
- Wu, D., Tang, S., He, Z., Odongo, E. N., Tan, Z., Han, X., Zhou, C., Kang, J., and Wang, M. (2013). Oleic and linoleic acids alter fermentation characteristics, methane and fatty acid isomers production during *in vitro* incubation with mixed ruminal microbes. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 11, 464-469.

Zened, A., Enjalbert, F., Nicot, M. C., and Troegeler-Meynadier, A. (2013). Starch plus sunflower oil addition to the diet of dry dairy cows results in a trans-11 to trans-10 shift of biohydrogenation. *Journal of Dairy Science*, 96, 451-459.

5 DISCUSIÓN GENERAL

En esta memoria se presentan cuatro estudios en los que se han investigado los efectos de varios factores de variación sobre los procesos de degradación y fermentación en el rumen, con especial énfasis en el metabolismo lipídico. En los cuatro estudios se han utilizado métodos *in vitro* de cultivo de los microorganismos del rumen, utilizando en tres de ellos (capítulos 4.2, 4.3 y 4.4) un simulador de la fermentación ruminal (RUSITEC) que consiste en un fermentador de flujo semicontinuo. En el otro estudio (capítulo 4.1) se empleó un incubador ANKOM que es un fermentador sin renovación del medio de cultivo utilizado para estimar la digestibilidad *in vitro* de los sustratos incubados.

Los factores de variación investigados han sido el pH en el medio de incubación (capítulos 4.1 y 4.2), el tipo de alimento sometido a fermentación ruminal, en particular la proporción de forraje o alimentos concentrados en el pienso (capítulos 4.1 y 4.2) y la suplementación lipídica del pienso (capítulos 4.3 y 4.4) con aceites de origen diverso (vegetal o marino) y muy diferente composición en ácidos grasos insaturados. Por último, se ha analizado la respuesta en las siguientes variables: la degradación del sustrato fermentado (en todos los estudios), el patrón y los productos finales de la fermentación ruminal y los cambios en la hidrogenación de los ácidos grasos de cadena larga insaturados aportados con el pienso, con énfasis en la formación de intermediarios (tales como el ácido linoleico conjugado, ALC) en dicho proceso de hidrogenación (capítulos 4.2, 4.3 y 4.4).

5.1 MÉTODOS IN VITRO PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL

Existen diferentes métodos *in vitro* para el estudio de la fermentación ruminal ([López, 2005](#)) que, en general, se pueden clasificar en dos grandes grupos: por un lado, aquellos en los que se utilizan cultivos no renovados de microorganismos ruminales y, por otro lado, los métodos en los que hay una renovación del medio para prolongar el cultivo de los microorganismos ruminales durante periodos relativamente largos. Dentro del primer grupo se

incluirían las incubaciones en serie (*batch cultures*) de corta duración (hasta 48 h) para determinar la digestibilidad del sustrato incubado ([Tilley y Terry, 1963](#)) o la acumulación de productos finales de la fermentación. Uno de estos métodos ha sido utilizado en uno de los estudios (capítulo 4.1) para analizar el efecto del pH en el medio de cultivo sobre la digestibilidad *in vitro* de forrajes con diferencias manifiestas en el contenido y la composición de la pared celular vegetal. Dentro del segundo grupo de métodos estarían aquellos en los que se simula la fermentación en el rumen, entre los que pueden distinguirse dos tipos: los fermentadores de flujo semicontinuo ([Czerkawski y Breckenridge, 1977](#)) y los fermentadores flujo continuo ([Hoover y col., 1982](#); [Hoover y col., 1984](#)). En los estudios que se presentan en los capítulos 4.2., 4.3 y 4.4 se ha utilizado el fermentador RUSITEC que es de flujo semicontinuo ya que el medio de cultivo se renueva mediante una infusión continua de saliva artificial, mientras que el sustrato fermentado está contenido en un compartimento (bolsa de material sintético poroso) y se aporta cada día de una sola vez. A su vez, los gases de fermentación y la digesta líquida fluyen de forma continua fuera del fermentador y son recogidos en contenedores específicos, mientras que la digesta sólida es el residuo que permanece en la bolsa tras un determinado periodo de incubación y se retira diariamente de una sola vez para la determinación de la fracción no digerida de sustrato.

Un método *in vitro* no es más que un modelo biológico que intenta representar la realidad, aquello que ocurriría en el animal en las mismas condiciones experimentales. En este sentido, cabe esperar que los métodos *in vivo* sean los que más se aproximen a la realidad y los que aporten una información más exacta sobre los fenómenos que se estudian. Sin embargo, no siempre es posible realizar experimentos *in vivo* tales como los que constituyen este estudio. En primer lugar, por su elevado coste. En segundo lugar, porque se precisan animales con modificaciones quirúrgicas (fístulas y cánulas en diferentes partes del trato digestivo) para poder acceder a la digesta contenida en el rumen o en el intestino. Estas modificaciones hacen que se plantee si las observaciones en estos animales se corresponden con lo que ocurriría en condiciones de campo, con los animales en situaciones prácticas de producción siendo alimentados normalmente. Además, se suscitan cuestiones

relacionadas con el bienestar y la ética por la utilización de animales en la experimentación. Y, por otra parte, también hay cuestiones relacionadas con el propio diseño experimental y la metodología de los estudios. En condiciones *in vivo* no es posible un ajuste preciso de los factores de variación. Por ejemplo, no es factible ajustar el pH del rumen a un determinado valor, lo que hace que los efectos observados puedan deberse a causas que no se pueden controlar. Además, algunas de las determinaciones relacionadas con la fermentación en el rumen no pueden llevarse a cabo *in vivo*, o su determinación es muy compleja. Aquí podría mencionarse la cuantificación de la producción de AGV o la síntesis de proteína microbiana en el rumen. En el primer caso, habitualmente se mide la concentración de AGV en el rumen, pero no siempre es una aproximación fiable de la cantidad de AGV realmente producidos por la fermentación del sustrato.

El método *in vitro* empleado en el capítulo 4.1 permite una determinación sencilla de la digestibilidad de sustrato (desaparición de materia de la bolsita incubada) y cómo se ve afectada en respuesta a cambios en el pH o a la adición de sustratos fermentables al medio de cultivo. Se ha utilizado un incubador ANKOM, un procedimiento ampliamente reconocido para la determinación de la digestibilidad *in vitro* de los alimentos para los rumiantes. En este caso el objetivo no fue tanto obtener una determinación exacta de dicho parámetro, como analizar los efectos de las variaciones en las condiciones de incubación sobre la digestibilidad. Por ese motivo, se introdujeron algunas modificaciones sobre el protocolo estándar de la técnica. La más importante fue que la incubación de las muestras en líquido ruminal tuvo una duración de 24 h, en lugar de las 48 h que suelen utilizarse. Este cambio ya ha sido justificado anteriormente. Con una incubación más corta es posible que los valores estimados de digestibilidad no sean una aproximación exacta a los reales, pero se ha considerado que al acortar la duración de la incubación es más probable que la técnica sea más sensible. La precisión (en cuanto a comparación entre tratamientos) no debe verse afectada por este cambio y es previsible que a las 24 h de incubación las diferencias entre tratamientos sean más manifiestas. Además, al no haber renovación en el medio de cultivo, la acumulación de AGV puede provocar problemas sobre todo

en condiciones de pH más bajos. De acuerdo con el procedimiento estándar, se utiliza una disolución tampón con un elevado poder amortiguador que mantiene el pH cercano a la neutralidad, de forma que el mantenimiento de la incubación a 48 h no plantea un problema. Sin embargo, en el estudio se planteaban situaciones con pH más bajos, utilizando para ello disoluciones tampón con un menor poder amortiguador. En estas condiciones, la prolongación de la incubación durante periodos más largos puede verse comprometida. Por todo ello se optó por incubaciones a 24 h en las que ha sido posible observar los efectos que se pretendía analizar según el planteamiento experimental del estudio.

En cuanto a los estudios en los que se utilizaron los fermentadores RUSITEC, la principal ventaja es el control preciso de las condiciones de fermentación y de los factores de variación, con un aparato relativamente simple. Usando esta técnica es posible determinar con precisión las entradas y salidas, incluidos los gases de fermentación, e investigar lo que ocurre dentro de los recipientes de reacción ([Czerkawski, 1984](#)). Además, es posible medir simultáneamente la mayoría de los parámetros de fermentación: degradación del sustrato (tasa de desaparición de la materia seca y sus constituyentes), los productos de la fermentación (AGV, gas, amoníaco) y la síntesis microbiana, de forma que se puede establecer con relativa facilidad el balance de la fermentación. Esta característica del sistema RUSITEC supone una ventaja sobre las técnicas *in vivo*, en las que los aspectos cuantitativos son difíciles de controlar ([Blanchart y col., 1989](#)). Los fermentadores son capaces de detectar con precisión las mismas diferencias entre dietas o entre tratamientos que se observan en el animal ([Carro y col., 2009](#)), a pesar de que los valores en términos absolutos puedan no coincidir con total exactitud ([Hristov y col., 2012](#)). Una de las principales limitaciones que se han descrito en relación con los fermentadores RUSITEC es el tamaño de poro de las bolsas que contienen el sustrato de fermentación, ya que con poros demasiado grandes se sobreestima la degradación de sustrato y a medida que se reduce el tamaño del poro se limita la proliferación de los protozoos ([Carro y col., 1995](#)). Además, otras limitaciones son el uso de una disolución amortiguadora con elevado poder tampón que reduce las variaciones en el pH del rumen a lo largo del día y la

dificultad de poder variar el tiempo de incubación del sustrato para ajustarlo a los tiempos de permanencia en el rumen, un aspecto especialmente crítico con alimentos concentrados ([Carro y col., 2009](#)). Por este motivo, se ha sugerido que es un sistema más adecuado para el estudio de la fermentación de dietas con una elevada proporción de forrajes, y más limitado cuando se incuban piensos con un mayor contenido en concentrados ([Carro y col., 2009](#)). En cualquier caso, cabe destacar que el sistema permite cuantificar de forma más sencilla que en condiciones *in vivo* y con una precisión aceptable la formación de productos finales de la fermentación (AGV, gas, metano) y la síntesis de proteína microbiana ([Carro y Miller, 2002](#)). El hecho de que en fermentadores RUSITEC se pueda muestrear la digesta con relativa facilidad hace que también sea posible la estimación de la medida en que ocurren los procesos de hidrogenación de los ácidos grasos y de formación de los intermediarios de dicho proceso. En una comparación crítica entre los diferentes métodos comúnmente utilizados (*in vivo*, *in situ* e *in vitro*), [Fievez y col. \(2007\)](#) concluyeron que los métodos *in vitro*, en particular los fermentadores continuos, son herramientas idóneas para el estudio de los cambios en el perfil de los ácidos grasos en la digesta como consecuencia de su hidrogenación en el rumen. Recientemente se ha propuesto un método *in vivo* para mejorar las estimaciones de la hidrogenación de los ácidos grasos en el rumen ([Baldin y col., 2018](#)). En cualquier caso, numerosos estudios avalan que, a efectos comparativos, el RUSITEC permite discernir con precisión las diferencias relativas entre dietas o los efectos de los factores nutricionales analizados ([Martínez y col., 2010](#)).

5.2 LA DIGESTIBILIDAD RUMINAL DEL ALIMENTO

En las técnicas *in vitro* de digestibilidad de los alimentos este parámetro se determina a partir de la desaparición de sustrato. En todos los experimentos realizados, el sustrato objeto de estudio se introduce en bolsitas de material sintético poroso y, de esta forma, es sometido a la acción de los microorganismos y sus enzimas al disponer dichas bolsitas en el interior de los fermentadores. Al cabo de un determinado tiempo de incubación (24 h en el incubador ANKOM y 48 h en las vasijas RUSITEC), se asume que el residuo que permanece dentro de la bolsa representa la fracción que no ha sido

degradada y, por tanto, que la que ha desaparecido (diferencia entre lo inicialmente pesado dentro de la bolsa y dicho residuo) es equivalente a la digestibilidad ruminal del sustrato (o de alguno de sus componentes químicos o fracciones nutritivas) ([López, 2005](#)). Este procedimiento permite obtener una determinación rápida, sencilla, relativamente poco costosa y precisa de la digestibilidad (o degradabilidad ruminal) de los alimentos, pero también se reconocen algunas limitaciones. La más importante es que hay partículas o fracciones del sustrato que pueden salir de la bolsa sin haber sido degradadas, lo que puede ocasionar cierto error en la determinación. Dicho error es mayor a medida que es mayor el tamaño de poro del material con el que se confeccionan las bolsitas (25 µm en las que se usan en el incubador ANKOM y 100 µm en las que se usan en el RUSITEC). Dicho tamaño tampoco puede ser tan pequeño que restrinja el acceso de los microorganismos al interior de la bolsa y, por tanto, al sustrato que ha de digerirse. Esto es especialmente importante en el caso del RUSITEC, donde se usan bolsas con un tamaño de poro relativamente grande para favorecer el acceso y la persistencia de los protozoos; pero que favorece la pérdida de material no digerido provocando una sobreestimación de la digestibilidad ([López, 2005](#)). En sentido contrario actúa la contaminación microbiana del residuo de incubación que hace que se sobreestime el residuo indigerido y se subestime la digestibilidad del sustrato, especialmente de algunas de sus fracciones tales como la proteína bruta. Otro aspecto a tener en cuenta sería el tiempo de incubación que, en estas técnicas, es siempre el mismo. En condiciones ideales dicho tiempo debería estar relacionado con el ritmo de paso de la digesta y el tiempo de permanencia de cada alimento en el rumen. En cualquier caso, tal y como se ha mencionado anteriormente, las técnicas permiten detectar con precisión las diferencias relativas y son una herramienta útil para este tipo de estudios.

5.2.1 Efecto del pH y del porcentaje de concentrado en el pienso

Estos efectos se investigaron en los estudios descritos en los capítulos 4.1 y 4.2. Es oportuno mencionar que en condiciones *in vivo* no hubiese sido posible disociar ambos efectos. Cuando el animal consume alimentos concentrados, con un alto contenido en compuestos rápidamente fermentables (hidratos de carbono no estructurales), hay una mayor producción de AGV y,

consecuentemente, se produce un descenso del pH en el rumen. Los efectos que se observan sobre la digestión del sustrato pueden ser debidos al tipo de sustrato fermentable o al descenso del pH en el rumen, sin que sea posible discernir qué efecto es el que provoca cambios en la microbiota, en la fermentación microbiana y en la cantidad de alimento que se digiere. En los dos estudios referidos se han diseñado pruebas experimentales con el fin de separar ambos efectos. Así, en los ensayos de digestibilidad *in vitro* se varió el pH utilizando disoluciones tampón con diferente composición sin cambiar el sustrato de fermentación. En otros casos se añadió al medio un sustrato de fermentación (heno o harina de cebada) con el propósito de provocar cambios en las comunidades microbianas en los cultivos. Estos experimentos constituyeron ensayos preliminares a la realización del experimento con el RUSITEC, ya que se pudo evaluar cómo se podían conseguir cambios en el pH en el medio de cultivo y en qué medida se afectaba a la digestibilidad del alimento. El experimento RUSITEC se planteó de acuerdo a un diseño factorial, intentando que ambos factores fuesen independientes. Se realizó una comparación entre dos piensos con diferentes porcentajes de forraje y de concentrado y, por otra parte, se utilizaron dos disoluciones tampón para limitar el pH a dos valores diferentes (uno en torno a la neutralidad y el otro más ácido considerado como subóptimo para la fermentación).

En general, se acepta que al disminuir el pH ruminal también disminuye la digestibilidad del alimento. Este descenso se hace más acusado cuando el pH disminuye por debajo de 6, situación reconocida como de acidosis ruminal. La acidosis viene determinada no sólo por un valor más bajo de pH sino, además, por el periodo durante el que persiste dicho pH ácido. Estos valores de pH ácido inhiben a la microbiota ruminal y a su actividad enzimática, sobre todo a los microorganismos con actividad fibrolítica. Como consecuencia, se reduce la digestibilidad del alimento en el rumen, especialmente la de la fibra (carbohidratos estructurales de la pared celular vegetal). Este efecto se pudo comprobar en los estudios ANKOM #2 y #4, observándose cómo al disminuir del pH del rumen desde valores en torno a 7 hasta valores por debajo de 6, se reducía la digestibilidad de cuatro forrajes (heno de alfalfa, heno de hierba, paja y pulpa de remolacha). El efecto fue más o menos acusado dependiendo del

contenido y composición de la pared celular de cada uno de los alimentos ensayados. En el experimento realizado con fermentadores RUSITEC, con el pH más bajo los coeficientes de desaparición de sustrato fueron numéricamente inferiores, aunque en la mayoría de los casos las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas. Es importante destacar que al cambiar la composición de la saliva artificial se consiguió reducir el pH en el medio de cultivo, pero el valor no llegó a situarse por debajo de 6. Es decir, aunque las condiciones de fermentación fueron subóptimas, probablemente no se alcanzaron valores considerados como de acidosis ruminal.

En cuanto al tipo de sustrato fermentable, en los estudios de digestibilidad *in vitro* se utilizaron dos estrategias para investigar este efecto. Por una parte, añadiendo al medio de cultivo heno o harina de cebada. Por otra parte, utilizando como inóculo líquido ruminal de animales alimentados con piensos con diferente porcentaje de forraje (100, 50 o 20 %). Como cabía esperar, se observó que la adición de cebada al medio de cultivo o la utilización como inóculo de líquido ruminal de animales alimentados con dietas ricas en concentrados provocaba una disminución en la digestibilidad de los alimentos. Dicho efecto fue variable para cada forraje, dependiendo de su composición, especialmente de su contenido en fibra y en cada una de las fracciones que la constituyen. En ambas situaciones, se produjo un descenso del pH en el medio de cultivo, por lo que no fue posible diferenciar el posible efecto del tipo de sustrato fermentable *per se* del efecto derivado de la bajada de pH.

En el ensayo RUSITEC, a ambos valores de pH la digestibilidad del pienso con un mayor porcentaje de concentrado fue mayor que la del pienso con un mayor contenido en forraje. Este no sería un efecto directo del tipo de alimento sobre los microorganismos o su actividad enzimática, sino más bien la consecuencia de la diferente composición de ambos piensos, al incluir el pienso con más concentrado un mayor porcentaje de ingredientes más digestibles. Además, con este tipo de pienso es previsible que el tamaño de partícula tras la molturación del material para ser incubado sea menor y, por tanto, es más probable que se produzcan pérdidas de partículas de la bolsa, sobreestimándose, en mayor medida, su digestibilidad.

5.2.2 Efecto de la suplementación lipídica

Este efecto se investigó en los estudios con fermentadores RUSITEC descritos en los capítulos 4.3 y 4.4. En ambos casos, la desaparición de materia del interior de la bolsa donde se incubó el alimento y la producción total de gas de fermentación se utilizaron como indicadores de la medida en la que el pienso era degradado y fermentado por los microorganismos del rumen. En el primer estudio, la adición de aceites vegetales al pienso (hasta un 6 % de la MS) no provocó un descenso en la desaparición aparente de sustrato ni en la producción total de gas en comparación con el pienso sin suplementación lipídica. Tan solo se observó que la degradación de sustrato fue mayor cuando se añadió aceite de linaza que al añadir aceite de girasol. En el segundo estudio no se apreciaron diferencias entre tratamientos en la degradación de la mayoría de los componentes del alimento (MS, MO, FAD o PB) ni en la producción total del gas cuando el pienso se suplementó con un 2 % de aceite de girasol sin más o con un 1 % adicional de aceite de pescado o de algas marinas.

En ambos estudios la desaparición de grasa fue menor en el tratamiento control que en los tratamientos en los que se añadió aceite, si bien este efecto parece ser el resultado del método empleado para la determinación de la digestibilidad *in vitro*. Cuando la digestibilidad aparente de los lípidos en el rumen se ha determinado a partir del flujo duodenal de AG se han estimado valores negativos como consecuencia de la contribución de los lípidos de origen microbiano que llegan al intestino. [Jenkins \(1993\)](#) estimó la digestibilidad real de los lípidos en el rumen por regresión concluyendo que su valor era inferior a un 15 %. En estos casos, la digestibilidad es un índice de la cantidad de lípidos que se absorben en el rumen (glicerol de los triglicéridos) y no llegan al intestino, y no aporta información sobre la medida en que los glicéridos son hidrolizados liberando AG no esterificados. Por el contrario, cuando la digestibilidad de la grasa se determina a partir de su desaparición de las bolsas de incubación (tal y como se hace en el RUSITEC), hay una sobreestimación de la digestibilidad, ya que los aceites líquidos pueden salir de la bolsa sin sufrir degradación alguna. Por este motivo, estos coeficientes de desaparición deben ser interpretados con cautela.

En ambos estudios se realizaron ensayos posteriores diseñados para determinar la actividad degradativa (amilolítica y celulolítica) en los fermentadores RUSITEC. En el primer estudio se observó que la adición de aceites vegetales (6 %) provocaba una pequeña depresión de ambas actividades (amilolítica y celulolítica), mientras que en el segundo estudio apenas se observó un efecto significativo sobre la actividad fermentativa cuando se añadió aceite de girasol solo o con un 1 % adicional de aceites de pescado o de algas.

La adición de lípidos puede reducir la digestión del alimento en el rumen ([Coppock y Wilks, 1991](#); [Jenkins, 1993](#)) mediante la formación de una barrera que impide la adhesión y colonización de los microorganismos, los efectos de los AG sobre la microbiota del rumen por la posible toxicidad de la grasa sobre ciertos microorganismos ([Palmquist y col., 1986](#)) o la inhibición de la actividad microbiana por el efecto de los ácidos grasos a nivel de las paredes y membranas celulares de los microorganismos ([Palmquist y Jenkins, 1980](#)). Al igual que lo observado en nuestros estudios, los efectos inhibidores de la fermentación de sustrato son más notorios cuando se usan sustratos purificados ([Brooks y col., 1954](#)). La adición de grasa afecta, fundamentalmente, a la digestión ruminal de los carbohidratos estructurales y, por tanto, de la fibra ([Jenkins, 1993](#)). Dicho efecto dependería de la composición de la dieta, en particular de la proporción de forraje y concentrado en el pienso y del tipo de forraje. Así, por ejemplo el efecto parece ser más manifiesto cuando el forraje de la ración es un ensilado ([Martínez y col., 2011](#)). En algunos estudios se ha observado que las grasas reducen en mayor medida la digestibilidad de los piensos con una mayor proporción de concentrado ([Ueda y col., 2003](#)). Sin embargo, en un análisis conjunto de todos los resultados publicados durante una década, se concluyó que con dietas ricas en concentrados podía añadirse hasta un 6 % de suplemento lipídico sin efecto sobre la digestión del alimento, mientras que el límite en la suplementación lipídica era tan sólo de un 3 % cuando se añadía a forrajes ([Hess y col., 2008](#)). La adición de grasa solo parece tener efectos negativos sobre la digestión la fibra, y no afecta a la digestión de los hidratos de carbono no estructurales o la degradación de la proteína ([Martínez y col., 2011](#)).

No obstante, los principales factores que determinan dicho efecto son el nivel de adición de la grasa y la composición de la grasa, en particular el grado de saturación de los ácidos grasos ([Jenkins, 1987](#)). En general, se acepta que cuanto mayor es el grado de insaturación de los ácidos grasos, mayor es su efecto tóxico sobre las bacterias ruminales ([Palmquist y Jenkins, 1980](#); [Maia y col., 2007](#)). Nuestros resultados estarían en consonancia con estos principios, ya que los efectos fueron diferentes al utilizar unos u otros aceites y dependieron del nivel de suplementación lipídica. Así, los efectos fueron más marcados en el primer estudio (capítulo 4.3), cuando el nivel de adición de aceites fue de un 6 %, si bien las diferencias con el pienso suplementado no llegaron a ser estadísticamente significativas. Este efecto no suele observarse con niveles de suplementación lipídica inferiores a un 5 %, independientemente del grado de insaturación de las grasas, su forma de presentación o su procesado. La reducción en la digestibilidad de la fibra es mayor cuando se usan fuentes de grasa ricas en ácidos grasos poliinsaturados de más de 20 carbonos ([Martínez y col., 2011](#)). Aunque los aceites de pescado y algas, más ricos en AG poliinsaturados podrían ejercer un mayor efecto inhibitor de la microbiota y, por tanto, depresor de la degradación en el rumen, este efecto no fue observado en el segundo estudio (capítulo 4.4), probablemente por el bajo nivel de suplementación del pienso (1 % con estos aceites). Actualmente se recomienda que el contenido en grasa de los piensos completos para rumiantes no supere un 6-7 % de la MS ([Knapp y col., 2014](#)).

5.3 EL PATRÓN DE FERMENTACIÓN RUMINAL

Los cambios en el patrón de fermentación ruminal hacen referencia a efectos sobre la formación de productos finales de la fermentación microbiana (metano, AGV, lactato, amoníaco) y sobre la síntesis de proteína microbiana registrados en los fermentadores RUSITEC. Los factores investigados fueron el pH ruminal y la relación forraje:concentrado en el pienso (capítulo 4.2) y la suplementación lipídica del pienso con aceites de origen vegetal o marino (capítulos 4.3 y 4.4).

5.3.1 Efecto del pH y del porcentaje de concentrado en el pienso

Ni la composición del pienso (en cuanto a las proporciones de forraje y concentrado) ni el pH del rumen afectaron a la producción de metano. Aunque la producción total de gas de fermentación fue mayor con el pienso con un mayor contenido en concentrado y cuando el pH fue más alto, este efecto se vio compensado por una menor concentración de metano en el gas. Se ha considerado que la producción de metano por unidad de sustrato fermentado aumenta cuando el rumiante consume alimentos con un mayor contenido en fibra, ya que se favorece a las rutas metabólicas que dan lugar a la formación de CO_2 e H_2 a partir de los cuales los microorganismos metanogénicos forman el CH_4 . De este modo, una mayor formación de metano iría acompañada de una mayor producción de acetato y una menor producción de propionato ([Russell, 2002](#)). Ninguno de estos efectos fue observado en el presente estudio, por lo que podría esperarse que tampoco hubiera un efecto sobre la producción de metano.

La producción total de AGV fue mayor con el pienso con mayor proporción de concentrado, y tendió a ser mayor con un pH más cercano a la neutralidad. También se observaron algunas diferencias significativas en el patrón de fermentación. No se apreciaron diferencias entre piensos en las producciones de acetato y propionato, aunque la ratio acetato:propionato fue mayor con el pienso C. Las producciones de otros AGV (butirato, valerato, caproato e isoácidos) y de lactato fueron mayores para el pienso C.

En general, con el pienso con una mayor proporción de concentrado se apreció, en comparación con el pienso con más forraje, una elevada ratio acetato: propionato, un predominio del butirato sobre el propionato y una alta producción de lactato. Un bajo contenido de fibra y un alto contenido de almidón (que favorece la formación de lactato como producto final de la fermentación), junto con la adición de aceite de girasol, que ejerce un efecto tóxico sobre las bacterias ([Maia y col., 2007](#)), podrían dar lugar a la mayor formación de butirato. Se ha sugerido que la población de bacterias productoras y/o la producción de butirato encuentran condiciones muy propicias para su desarrollo cuando confluye una dieta alta en concentrado, especialmente en un medio con un elevado poder tampón que evita el

descenso del pH que normalmente ocurre en el animal. Estas condiciones también podrían ser más favorables para especies bacterianas que utilizan el acetato y el propionato para sintetizar ácidos grasos de 5 y 6 C (valerato y caproato), y podrían explicar las ratios acetato:propionato observadas en este estudio y la elevada producción de butirato, valerato y caproato. Estos valores no suelen observarse cuando se analizan las concentraciones de AGV en muestras de digesta recogidas directamente del rumen de los animales ([Martínez y col., 2010](#)). [Carro y col. \(2009\)](#) sugirieron la posibilidad de que los fermentadores RUSITEC no simulasen fielmente la digestión ruminal de dietas con una elevada proporción de concentrados (como la representada por el pienso C), probablemente porque sería preciso reducir el tiempo de incubación (el tiempo de permanencia en el rumen es mucho más corto que el tiempo de incubación en el RUSITEC para estos alimentos) y porque la fermentación ocurre en un medio fuertemente tamponado que evita que el pH disminuya tal y como ocurre en el rumen del animal. El hecho de que la producción de butirato superase nítidamente a la de propionato con el pienso con menos forraje, pero no con el pienso con mayor proporción de forraje, y que la elevada formación de valerato y caproato se observase también en mayor medida con el pienso rico en concentrados sustenta este argumento. Con otro tipo de fermentadores (de flujo continuo), en los que el medio de cultivo no está tan fuertemente tamponado, [Calsamiglia y col. \(2008\)](#) observaron que con una dieta rica en concentrados la ratio acetato:propionato era menor que con una dieta más forrajera, debido a una mayor formación de propionato con la primera de las dietas.

Por otra parte, las producciones de acetato y de isoácidos, así como la ratio acetato:propionato, fueron menores al reducir el pH ruminal, pero este factor no afectó a las producciones de propionato, butirato y lactato. El pH afecta de forma diferencial a las distintas comunidades microbianas del rumen, de forma que al bajar el pH algunas especies se ven afectadas negativamente favoreciéndose el aumento de la abundancia relativa de otras especies. Esto explicaría los cambios observados en los productos finales de la fermentación.

La formación de amoníaco estuvo directamente relacionada con los cambios observados en la degradación de la proteína. El pienso con mayor

contenido en alimentos concentrados contiene también más proteína que, al ser degradada, contribuye a una mayor formación de amoníaco. Y el descenso del pH podría reducir la actividad proteolítica de las bacterias ([Erfle y col., 1982](#); [Calsamiglia y col., 2008](#)), lo que se refleja en una menor liberación de amoníaco y una menor formación de isoácidos que se originan a partir de la degradación de los aminoácidos. La síntesis diaria de proteína microbiana fue mayor con el pienso con mayor contenido en concentrado, pero no se vio afectada por el pH ruminal. Sin embargo, este efecto debería atribuirse a la mayor disponibilidad de energía para los microorganismos por un mayor aporte de MO fermentable, ya que no hubo diferencias ni entre piensos ni entre los dos valores de pH en la eficiencia de síntesis de proteína microbiana. Los niveles de amoníaco en la digesta y el hecho de que la eficiencia de síntesis de proteína microbiana fuese similar con ambas dietas sugieren que, a pesar de las diferencias en el contenido proteico de los piensos, el aporte de N no fue limitante para la síntesis de proteína microbiana ([Satter y Slyter, 1974](#); [Hackmann y Firkins, 2015](#)).

Este experimento fue diseñado con el propósito de separar los efectos del tipo de sustrato fermentable (hidratos de carbono más o menos fermentables según su contenido en polisacáridos no estructurales o en fibra) y del pH ruminal, y permitió obtener resultados en este sentido. En consonancia con las conclusiones extraídas por [Calsamiglia y col. \(2008\)](#) y [Calsamiglia y col. \(2012\)](#) hay efectos que son debidos al pH y otros que pueden ser atribuibles al tipo de sustrato fermentado, probablemente como consecuencia de cambios en la microbiota asociados a que los microorganismos dispongan de un tipo u otro de sustrato para los procesos de fermentación a partir de los que obtienen energía. En cualquier caso, a pesar de que en la mayoría de los casos la interacción no fue estadísticamente significativa, cabe esperar que pueda haber ciertos efectos confundidos, ya que la fermentación de alimentos concentrados provoca un mayor descenso del pH y el efecto del pH ruminal afecta de distinta manera a la fermentación de uno u otro tipo de alimento, siendo más adverso un pH ácido para la degradación de alimentos con un mayor contenido en fibra ([Calsamiglia y col., 2008](#)).

5.3.2 Efecto de la suplementación lipídica

En los dos experimentos con fermentadores RUSITEC en los que se investigó el efecto de la adición de aceites al pienso se observó una disminución significativa de la producción de metano en respuesta a la adición de aceites. Cuando se añadieron aceites de origen vegetal a un nivel de inclusión del 6 % en el pienso, la producción diaria de metano se redujo aproximadamente en un 20 %, siendo dicho efecto similar con los tres aceites (oliva, girasol y lino), independientemente de su composición en ácidos grasos. En el segundo experimento, cuando se añadió sólo un 2 % de aceite de girasol al pienso, la reducción en la producción diaria de metano fue de un 16 %, sugiriendo (al comparar los resultados de ambos experimentos para el mismo aceite) una posible relación dosis-respuesta. Cuando además del aceite de girasol se agregó un 1 % adicional de aceite de pescado o de algas, ricos en ácidos grasos poliinsaturados, la producción de metano se redujo hasta en un 22 %.

La adición de lípidos a la dieta puede reducir las emisiones de metano ([Broucek, 2018](#)), siendo este efecto más acusado cuando se usan aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados ([Beauchemin y col., 2007](#); [Hristov y col., 2013](#)). La reducción en la formación de metano puede deberse a la disminución en la degradación y fermentación ruminal de la materia orgánica. Sin embargo, considerando que dicha reducción no sólo se observó en la producción diaria de metano en los fermentadores sino, también, en la cantidad de metano por unidad de MO fermentada, debe pensarse que se trata más bien de un efecto específico que de una inhibición genérica de la fermentación. Es posible que el uso de hidrógeno durante el proceso de biohidrogenación de los ácidos grasos compita con el uso de dicho gas como sustrato para la metanogénesis ([Johnson y Johnson, 1995](#)). No obstante, se ha considerado que el efecto de las grasas sobre la producción de metano se debe, fundamentalmente, a los efectos tóxicos de los ácidos grasos sobre los microorganismos del rumen ([Giger-Reverdin y col., 2003](#)), en concreto sobre la actividad de las arqueas metanogénicas y el número de protozoos (que mantienen una relación ecológica muy estrecha con las arqueas). Dicho efecto es más acentuado a medida que aumenta el grado de insaturación de los ácidos grasos en los

aceites que se añaden al pienso, lo que justificaría que la adición de aceites muy insaturados (pescado, algas), a niveles de inclusión más bajos, ocasionen una reducción en la formación de metano similar a la detectada con niveles de adición más elevados de aceites vegetales. La disminución en la producción de metano estuvo acompañada de una disminución de la ratio acético:propiónico.

En consonancia con los resultados de degradación de los componentes del alimento, la adición de aceites al pienso no provocó cambios sustanciales en la producción total de AGV, de acuerdo con lo observado por otros autores ([Candyrine y col., 2017](#)). En el segundo experimento dicha producción fue ligeramente superior cuando se incubaron los piensos suplementados con grasas. Son más relevantes los cambios observados en las producciones de algunos de los AGV que indican un posible cambio en el patrón de fermentación. Con la suplementación lipídica (en ambos experimentos) se incrementó la producción total de propionato, un cambio que suele producirse cuando el patrón de fermentación se caracteriza por una menor producción de metano. Al no cambiar la formación de acetato, es también característico de este patrón de fermentación una menor ratio acetato:propionato. En el primer experimento la adición de aceites provocó una disminución en la formación de butirato, pero este efecto no se observó cuando se añadieron aceites de pescado o de algas a niveles más bajos de inclusión. Sin embargo, en el segundo experimento se observó una producción de butirato que llegó a superar a la de propionato, algo que no suele observarse *in vivo*; pero que, tal y como ha sido discutido anteriormente, puede advertirse en fermentadores RUSITEC cuando se incuban piensos con un alto porcentaje de concentrados. Los efectos sobre la producción de lactato también fueron diferentes en ambos experimentos, no observándose diferencias cuando se añadieron aceites vegetales e incrementándose en respuesta a la incorporación de aceites de origen marino. La alteración del patrón de fermentación es consecuencia del efecto de la suplementación lipídica sobre las poblaciones bacterianas, ya que el aporte de ácidos grasos con diferente grado de saturación puede favorecer a unos grupos de bacterias e inhibir la proliferación de otras especies ([AbuGhazaleh y Ishlak, 2014](#)).

De acuerdo con lo indicado por otros autores ([Doreau y Ferlay, 1995](#)), la adición de aceites al pienso no afectó a la síntesis de proteína microbiana ni a la eficiencia de dicho proceso en ninguno de los dos experimentos realizados. Este resultado sugiere que, independientemente de que pueda haber habido algún efecto específico que afectase a algún grupo microbiano de forma selectiva, las grasas usadas en ambos estudios a los niveles de inclusión de cada ensayo no parecen tener un efecto sobre el crecimiento microbiano en los fermentadores RUSITEC, ya que la cantidad de proteína microbiana y, previsiblemente, de biomasa microbiana total no se vio reducida al fermentar piensos suplementados con grasas con diferente composición en ácidos grasos.

5.4 EL PERFIL Y LA HIDROGENACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE CADENA LARGA EN EL RUMEN

En los estudios de perfil de ácidos grasos en los lípidos de la digesta o de los productos que se obtienen de los animales (carne o leche) se utiliza una metodología analítica similar a la empleada en los experimentos de la tesis. Básicamente, tras una extracción de la grasa, se lleva a cabo una hidrólisis de los glicéridos y una metilación de los ácidos grasos no esterificados para su detección e identificación mediante cromatografía de gases. Estas técnicas analíticas han sido desarrolladas y optimizadas durante las últimas décadas, permitiendo un importante avance dentro de este campo. Sin embargo, es preciso tener en cuenta las limitaciones de la información obtenida a partir de esta metodología. El resultado final es un cromatograma en el que el área de los picos es un indicador de la abundancia relativa de cada ácido graso en relación con el total de ácidos grasos detectados e identificados en el análisis. De esta forma se obtiene lo que ha sido denominado el perfil de ácidos grasos en el que la abundancia de cada AG se expresa como proporción relativa del total de AG detectados, pero no se obtiene una estimación de la concentración absoluta de cada AG en la matriz en la que se ha realizado el análisis. La valoración crítica y la discusión de la metodología para el análisis de ácidos grasos de cadena larga en muestras de digesta ruminal sobrepasan el alcance de este trabajo. En cualquier caso, las ventajas y las limitaciones de las técnicas utilizadas han sido revisadas y discutidas ampliamente por expertos

en este tema ([Aldai y col., 2005](#); [Christie y Han, 2010](#); [Brenna, 2013](#); [Cruz-Hernandez y col., 2013](#)). Es importante tener en cuenta que los perfiles de ácidos grasos en la digesta obtenidos con esta metodología puede condicionar el resultado observado y las estimaciones de las tasas de hidrogenación, lo que puede explicar, en parte, las discrepancias que se pueden apreciar entre distintos trabajos publicados en la bibliografía. Un ejemplo de la importancia de esta cuestión es que en el experimento en el que se añadieron aceites vegetales al pienso no se logró detectar la presencia de C18:2 c9t11 en los perfiles de ácidos grasos de las muestras de digesta analizadas, por lo que no se pudieron obtener resultados concluyentes acerca de los efectos de la suplementación lipídica sobre la formación de ácido linoleico conjugado en el rumen.

5.4.1 Efecto del pH y del porcentaje de concentrado en el pienso

Diversos estudios han demostrado que al disminuir el pH del rumen se reduce la hidrogenación. [Troegeler-Meynadier y col. \(2006\)](#) observaron que con un pH ruminal más bajo se reducía la isomerización de C18:2 c9c12 a C18:2 c9t11 y la saturación de C18:1 a C18:0, dando lugar a una acumulación de C18:1 t11. [Fuentes y col. \(2009\)](#) observaron que al bajar el pH de 6,4 a 5,6 se reducía la formación de C18:0, C18:1 t11 y C18:2 c9t11 y aumentaba la de isómeros *trans*-10 (C18:1 t10 y C18:2 t10c12), permaneciendo una mayor cantidad de C18:2 c9c12 y C18:3 c9c12c15 sin hidrogenar. Con estos resultados concluyeron que el pH del rumen era un factor con una influencia significativa sobre los procesos de hidrogenación ruminal de los AG poliinsaturados. [Troegeler-Meynadier y col. \(2014\)](#) confirmaron la menor hidrogenación de C18:2 c9c12 con una menor formación de ALC, así como el incremento en la formación de isómeros *trans*-10 al disminuir el pH. [Lee \(2013\)](#) demostró que la formación de isómeros *cis*9-*cis*11 y *cis*10-*cis*12 de ALC a partir de ácido linolénico (C18:3 c9c12c15) aumentaba al disminuir el pH ruminal, confirmando que en condiciones de acidez ruminal se producen cambios importantes en los procesos de saturación e isomerización de los AG. En general, la mayoría de los resultados publicados en la bibliografía apuntan hacia una reducción en la lipólisis y en la hidrogenación aparente de los ácidos linoleico y linolénico en el rumen al descender el pH ([Fuentes y col., 2011](#)).

En el experimento realizado con el RUSITEC, las diferencias entre los dos valores de pH en cuanto al perfil y la hidrogenación de los ácidos grasos en el rumen no fueron estadísticamente significativas. Lo más probable es que la ausencia de efectos debido al pH se deba al estrecho margen entre ambos valores, y a que el pH más bajo se situó en torno a 6,4 (con el pienso con mayor proporción de concentrado), por encima del umbral de 6 a partir del cual se considera que hay condiciones de acidosis ruminal. En cualquier caso, los resultados obtenidos parecen indicar una menor hidrogenación de los ácidos grasos de 18 C, con una menor proporción relativa de C18:0, confirmando la tendencia observada en la mayoría de los trabajos publicados. Es importante, no obstante, señalar que en nuestras muestras no se analizaron los isómeros *trans*-10 (mono o poliinsaturados) de ácidos grasos de 18 C.

En cuanto a la relación forraje:concentrado en el pienso, se dispone de una extensa información publicada en la bibliografía, si bien los efectos de este factor varían dependiendo de que haya o no suplementación lipídica. Como en nuestro experimento ambos piensos (con mayor o menor proporción de forraje y concentrado) fueron suplementados con 30 g de aceite de girasol/kg, en esta discusión nos referiremos, fundamentalmente a los efectos observados cuando los piensos se suplementaban con algún lípido. En general, cuando los rumiantes son alimentados en pastoreo o con dietas ricas en forraje el contenido en la leche de C18:1 *t*11, C18:3 *c*9*c*12*c*15 y C18:2 *c*9*t*11 es mayor que cuando se alimentan con raciones ricas en ensilado de maíz o concentrados ([Chilliard y col., 2007](#)). En una comparación entre piensos con diferente relación forraje:concentrado suplementados con aceite de lino, la hidrogenación ruminal de los ácidos grasos insaturados de 18 C (C18:3 *c*9*c*12*c*15, C18:2 *c*9*c*12 y C18:1 *c*9) fue mayor con el pienso con mayor proporción de forraje, ya que cantidad de dichos ácidos grasos que llegaba al duodeno era menor y la de C18:0 mayor que con la dieta más concentrada ([Loor y col., 2004](#)). [Gudla y col. \(2012\)](#) obtuvieron resultados similares en fermentadores de flujo continuo, de forma que tanto el C18:1 *t*11 como el C18:2 *c*9*t*11 aumentaron con el pienso con mayor proporción de forraje, mientras que la formación de C18:1 *t*10 y C18:2 *t*10*c*12 fue mayor con la dieta con un mayor contenido en concentrado. Sin embargo, utilizando

fermentadores *in vitro*, [Fuentes y col. \(2009\)](#) observaron que al aumentar la proporción de concentrado se reducía la formación de C18:1 *t*11 y C18:1 *t*10 y aumentaba la de C18:2 *t*10c12, permaneciendo una mayor cantidad de C18:2 c9c12 y C18:3 c9c12c15 sin hidrogenar. [Laverroux y col. \(2011\)](#) observaron que con un alimento concentrado era mayor la transformación de C18:1 *t*11 a C18:0 en comparación con un forraje, siendo posible que con alimentos más fibrosos el C18:1 *t*11 sufriese una isomerización convirtiéndose en otros AG monoinsaturados de 18 C. El principal efecto observado cuando las vacas lecheras recibieron un pienso con mayor proporción de concentrados fue un mayor flujo de C18:2 *t*10c12 desde el rumen ([Bernard y col., 2016](#); [Ventto y col., 2017](#)). Este efecto ha sido extensamente demostrado y [Zened y col. \(2013\)](#) concluyeron que al recibir una dieta con más alimentos concentrados se favorece la formación de isómeros *trans*-10 en detrimento de los isómeros *trans*-11, muy probablemente como consecuencia de los cambios en las comunidades microbianas implicadas en el metabolismo lipídico en el rumen. [Bauman y Griinari \(2001\)](#) plantearon que el síndrome de baja grasa en la leche inducido por la dieta es resultado de una alteración de la biohidrogenación ruminal que se desvía hacia la producción de C18:1 *t*10 y C18:2 *t*10c12.

Podría concluirse que con una dieta más forrajera hay una mayor hidrogenación de los ácidos grasos, dando lugar a una mayor producción relativa de C18:0 y a una menor persistencia de ácidos grasos insaturados. Además, con este tipo de dietas se favorece la aparición de isómeros *trans*-11 de C18:1 y C18:2, mientras que con un mayor aporte de concentrado hay un cambio hacia una mayor formación de isómeros *trans*-10. Es preciso tener en cuenta que esta tendencia general puede variar dependiendo de la cantidad de lípidos que aporten los concentrados y de la suplementación lipídica del pienso (nivel de inclusión y composición en ácidos grasos de los aceites añadidos). En el presente trabajo hay una menor proporción de C18:0 con el pienso C que con el pienso F, junto con una menor proporción de C18:2 c9*t*11, pero no se encontraron diferencias entre las dos dietas en la concentración de C18:1 *t*11. Estos resultados, en conjunto, sugieren que la biohidrogenación también puede estar ocurriendo a través de rutas metabólicas alternativas a la producción de

C18:1 *t*11, involucrando la producción de isómeros *trans*-10 que no fueron analizados en nuestro estudio; pero que se han relacionado con la biohidrogenación de las grasas en dietas altas en concentrado. Además, los resultados indican, en concordancia con lo publicado por otros autores, que la hidrogenación de los ácidos grasos es mayor con la dieta con un mayor contenido en forraje (y en fibra), en particular la del ácido oleico. No hay diferencias, sin embargo, en la hidrogenación del ácido linoleico que, en este experimento, podría haber sido más susceptible a procesos de isomerizaciones que a los de saturación de dobles enlaces.

5.4.2 Efecto de la suplementación lipídica

En los dos estudios en los que se investigaron los efectos de la suplementación lipídica del pienso (capítulos 4.3 y 4.4) se observó que la hidrogenación de los ácidos grasos y el porcentaje relativo de C18:0 en la digesta fueron superiores con el pienso control sin suplementar. También se determinaron tasas de hidrogenación superiores para el C18:3 *c*9*c*12*c*15 que para los otros ácidos grasos insaturados de 18 C, de acuerdo con los resultados de [Harvatine y Allen \(2006\)](#). En los tres experimentos realizados en el RUSITEC se determinaron proporciones de C18:0 en la digesta relativamente bajas, lo que podría sugerir que no hubo una hidrogenación completa de los ácidos grasos insaturados de 18 C. Además, la hidrogenación total varió considerablemente entre experimentos (comparando las estimaciones para los piensos control sin suplementación lipídica). En ambos casos se usaron piensos con elevada proporción de concentrado y de similar composición, aunque difirieron en su contenido en fibra. También se apreciaron diferencias entre ambos experimentos en la hidrogenación de cada uno de los ácidos grasos de 18 C. Por otra parte, en los tres experimentos RUSITEC hubo un pienso con alta proporción de concentrado al que se añadió aceite de girasol a diferentes niveles de inclusión (3 %, 6 % o 2 % de la MS, respectivamente). Al comparar el pienso control con el suplementado con aceite de girasol en cuanto a la hidrogenación total se advirtió que en un caso las diferencias fueron significativas (con 6 % de aceite de girasol) y en el otro (con 2 % de aceite de girasol) no se apreció un efecto significativo, sugiriendo que la respuesta depende del nivel de adición de aceite. Dentro de cada

experimento se observaron diferencias en la hidrogenación de los ácidos grasos entre los piensos suplementados con aceites y el pienso control no suplementado, pero no hubo diferencias entre los piensos suplementados con diferentes aceites. También hubo diferencias en la magnitud del efecto al comparar cada tratamiento con el control, de forma que cuando se añadieron aceites vegetales, los de oliva y girasol provocaron una reducción de la hidrogenación con respecto al control, pero el efecto del aceite de lino no fue significativo. Del mismo modo, en el otro experimento con la adición de aceite de girasol no hubo un efecto significativo, pero cuando se incorporaron aceites de pescado o de algas adicionalmente, la hidrogenación disminuyó significativamente. Las diferencias observadas entre experimentos (aunque obviamente no es posible realizar una comparación estadística) sugiere posibles variaciones en la capacidad de hidrogenación asociada al crecimiento de las comunidades bacterianas que prevalecen dentro de los fermentadores en cada caso, en línea con lo anteriormente discutido en relación con la formación de algunos AGV (en particular con el butirato).

En cuanto a los efectos de los aceites vegetales, se ha observado que al aumentar la concentración de C18:2 *c9c12* en el rumen, se satura su isomerización, pero se incrementa la producción de isómeros de ALC ya que se inhibe la hidrogenación de ALC a compuestos C18:1 y de estos a C18:0 ([Troegeler-Meynadier y col., 2006](#)). Del mismo modo, al aumentar la concentración de C18:3 *c9c12c15* también se inhibe la isomerización de ácidos grasos C18:2 y la hidrogenación completa hasta C18:0, lo que da lugar a la acumulación de isómeros *trans* de C18:1, especialmente de C18:1 *t11* ([Loor y col., 2004](#); [Troegeler-Meynadier y col., 2006](#); [Li y col., 2012](#)), y a la formación de múltiples isómeros de ALC ([Lee y Jenkins, 2011](#)). La adición de C18:1 *c9* también da lugar a un aumento en la formación de isómeros *trans* de C18:1 ([AbuGhazaleh y col., 2005](#)).

Por otra parte, está documentado que, tanto en experimentos *in vivo* ([Shingfield y col., 2012](#); [Toral y col., 2014](#); [Cieślak y col., 2015](#)) como *in vitro* ([Szczechowiak y col., 2016](#)), la suplementación con aceite de pescado va acompañada de un aumento en la concentración de C18:1 *t11* en el rumen, probablemente como resultado de la inhibición de su biohidrogenación y

conversión en C18:0 ([Toral y col., 2017](#)). Sin embargo, la respuesta varía con el tipo de dieta. La suplementación con aceites de pescado (solo o en combinación con aceites vegetales) aumenta la formación de isómeros con uno o más dobles enlaces *trans* ([Kairenius y col., 2018](#)). [Toral y col. \(2016\)](#) indicaron que también se producía un aumento en el C18:2 t10c12 cuando se añadía aceite de pescado a un pienso con elevado contenido en concentrados. Sin embargo, en el experimento con suplementación de aceites de pescado o de algas, no se observó un aumento en la proporción de C18:1 t11 como resultado de la adición de dichos aceites; aunque sí aumentó la proporción de C18:2 c9t11. Aunque no hubo diferencias entre tratamientos en la proporción relativa de C18:0, la suplementación con aceites de pescado o de algas provocaron una reducción en la hidrogenación de ácidos grasos insaturados de 18 C. [Li y col. \(2015\)](#) observaron que al añadir aceite de pescado y ácido málico a un pienso suplementado con aceite de lino aumentaba la formación de C18:2 c9t11 y C18:3 c9t11c15 en la digesta ruminal. Los cambios son similares cuando los piensos se suplementan con lípidos extraídos a partir de algas ([Boeckert y col., 2007](#); [Zhu y col., 2016](#)).

En general, los efectos que se observan en respuesta a una suplementación lipídica son una inhibición de la hidrogenación completa de los ácidos grasos que da lugar a un aumento en la formación de intermediarios en el proceso de hidrogenación, que pasan al intestino donde serán absorbidos. Dicha inhibición puede deberse a un efecto depresor sobre los microorganismos que llevan a cabo la saturación de los ácidos grasos o por el efecto de una mayor concentración de ácidos grasos insaturados sobre los procesos metabólicos implicados (por ejemplo, por la saturación de las enzimas por un exceso de sustrato). La medida en que se afecta a la hidrogenación de los ácidos grasos y en que aumenta la formación de intermediarios insaturados depende de la cantidad y de la composición de las grasas que se añaden al pienso (grado de insaturación de los ácidos grasos), ya que estos dos factores determinan sus efectos sobre la microbiota del rumen. Esta inhibición hace que cambien los perfiles de ácidos grasos en la digesta, aunque debe tenerse en cuenta que sobre dichos perfiles inciden no sólo las cantidades de cada ácido graso que aparecen y desaparecen por los procesos de hidrogenación, sino,

además, las de cada ácido graso que se añade con el suplemento lipídico. Es importante destacar y tener en cuenta este aspecto cuando los perfiles de ácidos grasos se expresan como porcentaje de cada ácido en la suma total de ácidos grasos, ya que un menor porcentaje no implica, necesariamente, una menor cantidad total de dicho ácido graso en la digesta. Con algunos matices, los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman la inhibición de la hidrogenación de los ácidos grasos y la formación de ciertos isómeros insaturados en respuesta a la suplementación del pienso con diferentes aceites de origen vegetal (oliva, girasol o lino) o marino (pescado o algas).

5.5 BIBLIOGRAFÍA

- AbuGhazaleh, A., and Ishlak, A. (2014). Effects of incremental amounts of fish oil on trans fatty acids and Butyrivibrio bacteria in continuous culture fermenters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98, 271-278.
- AbuGhazaleh, A. A., Riley, M. B., Thies, E. E., and Jenkins, T. C. (2005). Dilution rate and pH effects on the conversion of oleic acid to trans C18:1 positional isomers in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 88, 4334-4341.
- Aldai, N., Murray, B. E., Nájera, A. I., Troy, D. J., and Osoro, K. (2005). Derivatization of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1073-1083.
- Baldin, M., Rico, D., Green, M., and Harvatine, K. (2018). An *in vivo* method to determine kinetics of unsaturated fatty acid biohydrogenation in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 101, 4259-4267.
- Bauman, D. E., and Griinari, J. M. (2001). Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science*, 70, 15-29.
- Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., and Petit, H. V. (2007). Methane abatement strategies for cattle: Lipid supplementation of diets. *Canadian Journal of Animal Science*, 87, 431-440.
- Bernard, L., Toral, P., Rouel, J., and Chilliard, Y. (2016). Effects of extruded linseed and level and type of starchy concentrate in a diet containing fish oil on dairy goat performance and milk fatty acid composition. *Animal Feed Science and Technology*, 222, 31-42.
- Blanchart, G., Durand, M., Barry, J. L., Bouillieroudot, M., and Jouany, J. P. (1989). Advantages and limits of the semicontinuous artificial rumen (RUSITEC) for the study of rumen fermentations. *Annales de Zootechnie*, 38, 285-314.
- Boeckaert, C., Fievez, V., Hecke, D. V., Verstraete, W., and Boon, N. (2007). Changes in rumen biohydrogenation intermediates and ciliate protozoa diversity after algae supplementation to dairy cattle. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 767-777.
- Brenna, J. T. (2013). Fatty acid analysis by high resolution gas chromatography and mass spectrometry for clinical and experimental applications. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 16, 548-554.
- Brooks, C. C., Garner, G. B., Gehrke, C. W., Muhrer, M. E., and Pfander, W. H. (1954). The effect of added fat on the digestion of cellulose and protein by ovine rumen microorganisms. *Journal of Animal Science*, 13, 758-764.
- Broucek, J. (2018). Options to methane production abatement in ruminants: A review. *JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences*, 28, 348-364.
- Calsamiglia, S., Blanch, M., Ferret, A., and Moya, D. (2012). Is subacute ruminal acidosis a pH related problem? Causes and tools for its control. *Animal Feed Science and Technology*, 172, 42-50.
- Calsamiglia, S., Cardozo, P., Ferret, A., and 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, 702-711.

- Candyrine, S., Jahromi, M., Ebrahimi, M., Liang, J., Goh, Y., and Abdullah, N. (2017). *In vitro* rumen fermentation characteristics of goat and sheep supplemented with polyunsaturated fatty acids. *Animal Production Science*, 57, 1607-1612.
- Carro, M. D., Lebzien, P., and Rohr, K. (1995). Effects of pore size of nylon bags and dilution rate on fermentation parameters in a semi-continuous artificial rumen. *Small Ruminant Research*, 15, 113-119.
- Carro, M. D., and Miller, E. L. (2002). Comparison of microbial markers (N-15 and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. *Animal Science*, 75, 315-321.
- Carro, M. D., Ranilla, M. J., Martín-García, A. I., and Molina-Alcaide, E. (2009). Comparison of microbial fermentation of high- and low-forage diets in RUSITEC, single-flow continuous-culture fermenters and sheep rumen. *Animal*, 3, 527-534.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., and Doreau, M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 828-855.
- Christie, W., and Han, X. (2010). Lipid analysis-isolation, separation, identification and lipidomic analysis. Bridgwater: UK Oily Press.
- Cieślak, A., El-Sherbiny, M., Szczechowiak, D. K., Kowalczyk, D., Pers-Kamczyc, E., Bryszak, M., Szulc, P., Jóźwik, A., and Szumacher-Strabel, M. (2015). Rapeseed and fish oil mixtures supplied at low dose can modulate milk fatty acid composition without affecting rumen fermentation and productive parameters in dairy cows. *Animal Science Papers and Reports*, 33, 357-372.
- Coppock, C. E., and Wilks, D. L. (1991). Supplemental fat in high-energy rations for lactating cows: Effects on intake, digestion, milk yield, and composition. *Journal of Animal Science*, 69, 3826-3837.
- Cruz-Hernandez, C., Goeuriot, S., Giuffrida, F., Thakkar, S. K., and Destailats, F. (2013). Direct quantification of fatty acids in human milk by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1284, 174-179.
- Czerkawski, J. W. (1984). Microbial fermentation in the rumen. *Proceedings of the Nutrition Society*, 43, 101-118.
- Czerkawski, J. W., and Breckenridge, G. (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (RUSITEC). *British Journal of Nutrition*, 38, 371-384.
- Doreau, M., and Ferlay, A. (1995). Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: A review. *Livestock Production Science*, 43, 97-110.
- Erfle, J. D., Boila, R. J., Teather, R. M., Mahadevan, S., and Sauer, F. D. (1982). Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 65, 1457-1464.
- Fievez, V., Vlaeminck, B., Jenkins, T., Enjalbert, F., and Doreau, M. (2007). Assessing rumen biohydrogenation and its manipulation *in vivo*, *in vitro* and *in situ*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 740-756.

- Fuentes, M., Calsamiglia, S., Fievez, V., Blanch, M., and Mercadal, D. (2011). Effect of pH on ruminal fermentation and biohydrogenation of diets rich in omega-3 or omega-6 fatty acids in continuous culture of ruminal fluid. *Animal Feed Science and Technology*, 169, 35-45.
- Fuentes, M. C., Calsamiglia, S., Cardozo, P. W., and Vlaeminck, B. (2009). Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 92, 4456-4466.
- Giger-Reverdin, S., Morand-Fehr, P., and Tran, G. (2003). Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle. *Livestock Production Science*, 82, 73-79.
- Gudla, P., AbuGhazaleh, A., Ishlak, A., and Jones, K. (2012). The effect of level of forage and oil supplement on biohydrogenation intermediates and bacteria in continuous cultures. *Animal Feed Science and Technology*, 171, 108-116.
- Hackmann, T. J., and Firkins, J. L. (2015). Maximizing efficiency of rumen microbial protein production. *Frontiers in Microbiology*, 6, 465. Retrieve from Doi:10.3389/fmicb.2015.00465
- Harvatine, K. J., and Allen, M. S. (2006). Fat supplements affect fractional rates of ruminal fatty acid biohydrogenation and passage in dairy cows. *Journal of Nutrition*, 136, 677-685.
- Hess, B. W., Moss, G. E., and Rule, D. C. (2008). A decade of developments in the area of fat supplementation research with beef cattle and sheep. *Journal of Animal Science*, 86, E188-204.
- Hoover, W. H., Crawford, R. J., Jr., and Stern, M. D. (1982). Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. III. Solids retention time. *Journal of Animal Science*, 54, 849-854.
- Hoover, W. H., Kincaid, C. R., Varga, G. A., Thayne, W. V., and Junkins, L. L., Jr. (1984). Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. IV. pH and dilution rate. *Journal of Animal Science*, 58, 692-699.
- Hristov, A., Lee, C., Hristova, R., Huhtanen, P., and Firkins, J. (2012). A meta-analysis of variability in continuous-culture ruminal fermentation and digestibility data. *Journal of Dairy Science*, 95, 5299-5307.
- Hristov, A., Oh, J., Firkins, J., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H., Adesogan, A., Yang, W., and Lee, C. (2013). Special topics—mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science*, 91, 5045-5069.
- Jenkins, T. C. (1987). Effect of fats and fatty acid combinations on ruminal fermentation in semi-continuous *in vitro* cultures. *Journal of Animal Science*, 64, 1526-1532.
- Jenkins, T. C. (1993). Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 76, 3851-3863.
- Johnson, K. A., and Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73, 2483-2492.

- Kairenius, P., Leskinen, H., Toivonen, V., Muetzel, S., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Wallace, R., and Shingfield, K. (2018). Effect of dietary fish oil supplements alone or in combination with sunflower and linseed oil on ruminal lipid metabolism and bacterial populations in lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 101, 3021-3035.
- Knapp, J., Laur, G., Vadas, P., Weiss, W., and Tricarico, J. (2014). Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of Dairy Science*, 97, 3231-3261.
- Laverroux, S., Glasser, F., Gillet, M., Joly, C., and Doreau, M. (2011). Isomerization of vaccenic acid to cis and trans C18:1 isomers during biohydrogenation by rumen microbes. *Lipids*, 46, 843-850.
- Lee, Y. (2013). Effect of pH on conjugated linoleic acid (CLA) formation of linolenic acid biohydrogenation by ruminal microorganisms. *Journal of Microbiology*, 51, 471-476.
- Lee, Y.-J., and Jenkins, T. C. (2011). Biohydrogenation of linolenic acid to stearic acid by the rumen microbial population yields multiple intermediate conjugated diene isomers. *The Journal of Nutrition*, 141, 1445-1450.
- Li, X. Z., Gao, Q. S., Yan, C. G., Choi, S. H., Shin, J. S., and Song, M. K. (2015). Conjugated fatty acids and methane production by rumen microbes when incubated with linseed oil alone or mixed with fish oil and/or malate. *Animal Science Journal*, 86, 755-764.
- Li, X. Z., Yan, C. G., Lee, H. G., Choi, C. W., and Song, M. K. (2012). Influence of dietary plant oils on mammary lipogenic enzymes and the conjugated linoleic acid content of plasma and milk fat of lactating goats. *Animal Feed Science and Technology*, 174, 26-35.
- Loor, J. J., Ueda, K., Ferlay, A., Chilliard, Y., and Doreau, M. (2004). Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87, 2472-2485.
- López, S. (2005). *In vitro* and *in situ* techniques for estimating digestibility. In J. M. Forbes y J. France (Eds.), *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*, 2nd edn. CAB International, (pp. 87-121). Wallingford, UK.
- Maia, M. R. G., Chaudhary, L. C., Figueres, L., and Wallace, R. J. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91, 303-314.
- Martínez, A. L., Pérez, M., Pérez A, L., Gómez C, G., and Carrión P, D. (2011). Efecto de las fuentes de grasa sobre la digestión de la fibra en los rumiantes. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 12.
- Martínez, M. E., Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Ramos, S., and Carro, M. D. (2010). Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and RUSITEC fermenters. I. Digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. *Journal of Dairy Science*, 93, 3684-3698.
- Palmquist, D. L., and Jenkins, T. C. (1980). Fat in lactation rations: Review. *Journal of Dairy Science*, 63, 1-14.

- Palmquist, D. L., Jenkins, T. C., and Joyner, A. E., Jr. (1986). Effect of dietary fat and calcium source on insoluble soap formation in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 69, 1020-1025.
- Russell, J. B. (2002). *Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition*. Ithaca, N.Y: Cornell University.
- Satter, L. D., and Slyter, L. L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *British Journal of Nutrition*, 32, 199-208.
- Shingfield, K. J., Kairenius, P., Ärölä, A., Paillard, D., Muetzel, S., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Toivonen, V., and Griinari, J. M. (2012). Dietary fish oil supplements modify ruminal biohydrogenation, alter the flow of fatty acids at the omasum, and induce changes in the ruminal *Butyrivibrio* population in lactating cows. *The Journal of Nutrition*, 142, 1437-1448.
- Szczecowiak, J., Szumacher-Strabel, M., El-Sherbiny, M., Pers-Kamczyc, E., Pawlak, P., and Cieslak, A. (2016). Rumen fermentation, methane concentration and fatty acid proportion in the rumen and milk of dairy cows fed condensed tannin and/or fish-soybean oils blend. *Animal Feed Science and Technology*, 216, 93-107.
- Tilley, J., and Terry, R. (1963). A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Grass and Forage Science*, 18, 104-111.
- Toral, P. G., Bernard, L., Belenguer, A., Rouel, J., Hervás, G., Chilliard, Y., and Frutos, P. (2016). Comparison of ruminal lipid metabolism in dairy cows and goats fed diets supplemented with starch, plant oil, or fish oil. *Journal of Dairy Science*, 99, 301-316.
- Toral, P. G., Hervás, G., Carreño, D., Leskinen, H., Belenguer, A., Shingfield, K. J., and Frutos, P. (2017). *In vitro* response to EPA, DPA, and DHA: Comparison of effects on ruminal fermentation and biohydrogenation of 18-carbon fatty acids in cows and ewes. *Journal of Dairy Science*, 100, 6187-6198.
- Toral, P. G., Rouel, J., Bernard, L., and Chilliard, Y. (2014). Interaction between fish oil and plant oils or starchy concentrates in the diet: Effects on dairy performance and milk fatty acid composition in goats. *Animal Feed Science and Technology*, 198, 67-82.
- Troegeler-Meynadier, A., Bret-Bennis, L., and Enjalbert, F. (2006). Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. *Reproduction Nutrition Development*, 46, 713-724.
- Troegeler-Meynadier, A., Palagiano, C., and Enjalbert, F. (2014). Effects of pH and fermentative substrate on ruminal metabolism of fatty acids during short-term *in vitro* incubation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98, 704-713.
- Ueda, K., Ferlay, A., Chabrot, J., Looor, J. J., Chilliard, Y., and Doreau, M. (2003). Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage:concentrate ratios. *Journal of Dairy Science*, 86, 3999-4007.

- Ventto, L., Leskinen, H., Kairenius, P., Stefański, T., Bayat, A. R., Vilkki, J., and Shingfield, K. J. (2017). Diet-induced milk fat depression is associated with alterations in ruminal biohydrogenation pathways and formation of novel fatty acid intermediates in lactating cows. *British Journal of Nutrition*, 117, 364-376.
- Zened, A., Enjalbert, F., Nicot, M. C., and Troegeler-Meynadier, A. (2013). Starch plus sunflower oil addition to the diet of dry dairy cows results in a trans-11 to trans-10 shift of biohydrogenation. *Journal of Dairy Science*, 96, 451-459.
- Zhu, H., Fievez, V., Mao, S., He, W., and Zhu, W. (2016). Dose and time response of ruminally infused algae on rumen fermentation characteristics, biohydrogenation and Butyrivibrio group bacteria in goats. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7, 22.

6 CONCLUSIONES

1. La reducción del pH en los cultivos de microorganismos ruminales mediante cambios en la composición del medio de cultivo, la adición de sustratos con un mayor contenido en hidratos de carbono rápidamente fermentables o la inoculación de los cultivos con líquido ruminal de animales alimentados con piensos ricos en concentrados determina una disminución de la digestibilidad *in vitro* de los forrajes. Esta disminución está directamente relacionada con su contenido en fibra.
2. Al descender el pH ruminal desde 6,9 hasta 6,4 disminuye la digestibilidad del alimento, la producción de gas y la de ácidos grasos de cadena corta, en particular la de acético. También disminuye la degradación de la proteína del alimento, disminuyendo la liberación de amoníaco y la formación de isoácidos de cadena corta, aunque sin llegar a afectar a la síntesis de proteína microbiana. No hay cambios ni en la producción de metano ni en la de los ácidos propiónico, butírico y láctico. Con esa disminución del pH no llegan a observarse diferencias ni en la hidrogenación ni en el perfil de ácidos grasos de cadena larga en la digesta ruminal.
3. Cuando se digiere un pienso con una mayor proporción de alimentos concentrados, más digestibles, aumenta la producción de gas de fermentación, la de algunos ácidos grasos de cadena corta (butírico, valérico, caproico e isoácidos) y la de ácido láctico y amoníaco, así como la cantidad total de proteína microbiana sintetizada en el rumen. Sin embargo, no se observan cambios en la producción de metano o en la eficiencia de síntesis de la proteína microbiana. Al aumentar la proporción de alimentos concentrados en el pienso se incrementa la hidrogenación del ácido linolénico y se reduce la del ácido oleico, no observándose variaciones en la del ácido linoleico. Como resultado de estos cambios, se observan variaciones en el

perfil de ácidos grasos en la digesta ruminal, de forma que las proporciones relativas de ácido esteárico y de ácido linoleico conjugado (C18:2 c9t11) son más elevadas con una dieta con una mayor proporción de forraje.

4. El patrón de fermentación ruminal cambia al añadir un 6 % de aceite de oliva, de girasol o de linaza a piensos de ovejas lecheras, observándose una disminución de la ratio acetato:propionato y una reducción de la producción de metano y de la liberación de amoníaco, sin llegar a afectar a la eficiencia de síntesis de la proteína microbiana. La adición de estos aceites disminuye la actividad amilolítica y celulolítica en los fermentadores, especialmente con el aceite de linaza. La adición de aceites de oliva, girasol o linaza disminuye la hidrogenación de los ácidos grasos de cadena larga en el rumen, afectando de forma diferente a la saturación de cada ácido graso dependiendo de la composición en ácidos grasos insaturados de cada aceite utilizado como suplemento. De esta forma, el perfil de ácidos grasos de la digesta depende, por un lado, del perfil de ácidos grasos del aceite añadido al pienso y, por otro lado, de la medida en que cada aceite afecte a la hidrogenación de los ácidos grasos insaturados oleico, linoleico y linolénico.
5. La adición de un 1 % de aceite de pescado o de algas a un pienso de ovejas lecheras ya suplementado con un 2 % de aceite de girasol no afecta a la digestibilidad del alimento; pero reduce significativamente la producción de metano en la fermentación ruminal. Además, se producen cambios en el patrón de fermentación, observándose una disminución de la ratio acetato:propionato y una mayor producción total de ácidos grasos volátiles y de ácido láctico, sin afectar a la síntesis de la proteína microbiana. La adición de estos aceites no afecta a la actividad celulolítica en los fermentadores, observándose tan solo una pequeña disminución del ritmo de fermentación del almidón. La adición conjunta de aceites de pescado o algas y de aceite de girasol al pienso disminuye la hidrogenación de los ácidos grasos de cadena larga en el rumen, con un efecto diferente sobre la saturación de cada ácido

graso. De esta forma, se producen variaciones en el perfil de ácidos grasos de la digesta en respuesta a la adición de los aceites de pescado o de algas, entre las que cabe destacar un aumento en la proporción relativa de ácido linoleico conjugado (C18:2 c9t11).

6. La suplementación lipídica de piensos para rumiantes de alta producción afecta a los procesos de fermentación y de hidrogenación de los ácidos grasos de cadena larga en el rumen. Los efectos más consistentes son una disminución de la producción de metano y una reducción de la hidrogenación de los ácidos grasos insaturados, que afecta de forma diferente a los ácidos oleico, linoleico y linolénico, determinando la formación de ciertos ácidos grasos no contenidos en el alimento (tales como el vaccénico o el ácido linoleico conjugado) que pasan al abomaso y serán absorbidos en el intestino delgado. La magnitud de estos efectos es variable, dependiendo de la composición de la dieta, en particular de la cantidad de forraje y concentrado en el pienso, de la cantidad de grasa añadida al pienso y de su composición en cuanto a contenido en ácidos grasos más o menos insaturados.

SUMMARY

Effects of ruminal pH and diet composition on fatty acid hydrogenation and microbial fermentation in the rumen

This PhD thesis is a research work that includes four studies in which the effects of several factors of variation on the processes of degradation and microbial fermentation in the rumen, and more specifically on lipid metabolism, have been investigated. *In vitro* methods of culture of mixed rumen microorganisms have been used in all four studies. An ANKOM incubator was used in study 1 to determine the *in vitro* digestibility of feedstuffs. A ruminal simulation technique (RUSITEC), consisting in a semi-continuous flow fermenter, was used in studies 2, 3 and 4.

The factors of variation examined were ruminal pH (studies 1 and 2), the forage to concentrate ratio of the diet (studies 1 and 2) and the lipid supplementation of the feed (studies 3 and 4) with oils of diverse origin (vegetable or marine) and a variable composition in unsaturated fatty acids. Finally, the response to these factors was tested based on the ensuing end-points: feed digestibility (in all the studies), pattern and output of end-products from the ruminal fermentation of feed and changes in the hydrogenation of the feed unsaturated long chain fatty acids, with special emphasis on the formation of hydrogenation intermediates, such as conjugated linoleic acid (in studies 2, 3 and 4).

Study 1

Objective: to examine the effects of inoculum and sub-optimal pH in the fermentation medium on *in vitro* digestibility of high fibre forages.

Methodology: Four *in vitro* digestibility experiments were performed using the DAISY fermenter (ANKOM). To induce sub-optimal pH conditions, different substrates were added to the fermentation medium or the composition of the buffer solution was modified. The first two experiments were carried out using sheep as donors of ruminal digesta. In experiment #1, the pH of the rumen medium was modified by adding either grass hay or barley meal to the fermenters, while in

experiment #2 different McIlvaine buffer solutions were used to set the pH in the medium at values ranging between 7.0 and 5.8.

In experiments #3 and #4 rumen digesta from steers was used to inoculate the fermenters. In order to obtain inocula with different microbial composition, the donor animals were fed diets with different forage to concentrate ratios. In both experiments, the effects of the percentage of forage in the diet (100, 50 or 20 % forage) on ruminal pH and feed digestibility were assessed. In addition, in experiment #3, the effect of adding either grass hay or barley meal to the fermentation medium was studied. In experiment #4, pH in the fermenters was modified by using different buffer solutions to achieve pH values ranging from 7.0 to 5.0.

Conclusion: *In vitro* digestibility of forages is decreased when pH is reduced in cultures of mixed ruminal microbes by changing the buffer composition of the medium, by adding substrates rich in rapidly fermentable carbohydrates or by inoculating the cultures with ruminal fluid from animals fed high-concentrate rations. This decrease in digestibility is directly related to the forage fibre content.

Study 2

Objective: to investigate the effects of the forage to concentrate ratio in the diet and of the ruminal pH on the microbial fermentation pattern and the fatty acid composition of the digesta in RUSITEC fermenters.

Methodology: Sixteen RUSITEC fermenters inoculated with rumen digesta collected from sheep were used. The study was laid out in a 2 x 2 factorial experimental design: two diets with different forage to concentrate ratio (high-forage diet vs. high-concentrate diet) used as the fermentation substrate, and two ruminal pH (high pH = 6.9 vs. low pH = 6.4). The experiment lasted three weeks and during the last 14 days samples were collected and measurements recorded were: pH in fermenters, substrate disappearance after 48 h of incubation, total gas and methane production, volume of liquid effluent, volatile fatty acids (VFA), L-lactate and ammonia outputs, microbial protein synthesis (using ¹⁵N as a marker) and long chain

fatty acid profile in the digesta. Fatty acids were analysed by gas chromatography after fat extraction and methylation of fatty acids.

Conclusions: When ruminal pH is reduced from 6.9 to 6.4, feed digestibility and the production of fermentation gas and of short-chain fatty acids (in particular acetic acid) are decreased. Feed protein degradation is also decreased, producing less ammonia and short chain iso-acids, with no effect on the synthesis of microbial protein. With this decrease in pH there are no changes in other fermentation end-products, such as methane, propionic, butyric or lactic acids, and no significant differences in the hydrogenation and profile of long-chain fatty acids in the rumen digesta.

When a high concentrate diet is digested in the rumen, there is an increase in the production of fermentation gas, in the output of some short-chain fatty acids (butyric, valeric, caproic and iso-acids), lactic acid and ammonia, as well as in the microbial protein synthesis. However, methane production or efficiency of microbial protein synthesis are unaffected. Increasing the inclusion of concentrates in the diet increases the hydrogenation of α -linolenic acid reducing that of oleic acid, with no effect on that of linoleic acid. As a result of these changes, there are significant variations in the fatty acid profile in the rumen digesta, so that the relative proportions of stearic acid and conjugated linoleic acid (C18:2 c9t11) are greater with a high forage diet.

Study 3

Objective: to investigate the effects of adding different vegetable oils (olive, sunflower or linseed) to the diet on the microbial fermentation pattern and the fatty acid composition of the digesta in RUSITEC fermenters.

Methodology: Sixteen RUSITEC fermenters inoculated with rumen digesta collected from sheep were used. The study was laid out in a complete randomised design with four experimental treatments and four fermentation units per treatment. Control vessels were fed a total mixed ration (TMR) for dairy sheep with no fat added. The other three diets were the same TMR used in the control to which a vegetable oil was added to achieve a concentration of 6 % of the dry matter. The

supplemental oils were olive oil, sunflower oil or linseed oil. The experiment lasted three weeks and during the last 14 days samples were collected and measurements recorded were: pH in fermenters, substrate disappearance after 48 h of incubation, total gas and methane production, volume of liquid effluent, VFA, L-lactate and ammonia outputs, microbial protein synthesis (using ^{15}N as a marker) and long chain fatty acid profile in the digesta. Fatty acids were analysed by gas chromatography after fat extraction and methylation of fatty acids.

Conclusions: The ruminal fermentation pattern changes by adding 6 % olive, sunflower or linseed oil to dairy sheep diets, with a decrease in the acetate to propionate ratio and a reduction in methane and ammonia production, without affecting the efficiency of microbial protein synthesis. The addition of these oils decreases the amylolytic and cellulolytic activities in the fermenters, especially with linseed oil. The addition of olive, sunflower or linseed oils decreases the hydrogenation of the long chain fatty acids in the rumen, affecting the saturation of each fatty acid to a different extent depending on the composition of unsaturated fatty acids of each oil used as a supplement. Thus, the fatty acid profile in the ruminal digesta depends on the fatty acid composition of the oil added to the feed and on the extent to which the hydrogenation of oleic, linoleic and α -linolenic acids is affected by each supplemental oil.

Study 4

Objective: to investigate the effects of adding sunflower oil alone or in combination with either fish or algae oil to a high-concentrate diet on the microbial fermentation pattern and the fatty acid composition of the digesta in RUSITEC fermenters.

Methodology: Sixteen RUSITEC fermenters inoculated with rumen digesta collected from sheep were used. The study was laid out in a complete randomised design with four experimental treatments and four fermentation units per treatment. Control vessels were fed a TMR for dairy sheep with no fat added. The other three diets were the same TMR used in the control but supplemented with a) 2 % sunflower oil, b) 2 % sunflower oil + 1 % fish oil or c) 2 % sunflower oil + 1 % algae oil. The experiment lasted three weeks and during the last 14 days samples were

collected and measurements recorded were: pH in fermenters, substrate disappearance after 48 h of incubation, total gas and methane production, volume of liquid effluent, VFA, L-lactate and ammonia outputs, microbial protein synthesis (using ^{15}N as a marker) and long chain fatty acid profile in the digesta. Fatty acids were analysed by gas chromatography after fat extraction and methylation of fatty acids.

Conclusions: The addition of 1 % fish or algae oil to a dairy sheep diet already supplemented with 2 % sunflower oil does not affect feed digestibility, but gives rise to a significant reduction in methane production from ruminal fermentation. In addition, there are changes in the fermentation pattern, with a decrease in the acetate to propionate ratio and an increased production of total volatile fatty acids and lactic acid, with no effect on the microbial protein synthesis. The addition of these oils does not affect the cellulolytic activity in the fermenters, with a slight decrease in the fermentation rate of starch. The combined addition of sunflower oil with either fish or algae oil to the diet decreases the hydrogenation of the long chain fatty acids in the rumen, with a different effect on the saturation of each fatty acid. Consequently, there are changes in the fatty acid profile in the rumen digesta in response to the addition of fish or algae oils, including an increase in the relative proportion of conjugated linoleic acid (C18:2 c9t11).

Final conclusion

Lipid supplementation of diets for high-producing ruminants affects both the microbial fermentation and the long-chain fatty acid hydrogenation in the rumen. The most consistent effects are a decrease in methane production and a reduction in the hydrogenation of unsaturated fatty acids, affecting the oleic, linoleic and α -linolenic acids to a variable extent and determining the synthesis of certain intermediates such as vaccenic or conjugated linoleic acid that reach the abomasum and will be absorbed in the small intestine. The extent of these effects is variable and depends on the composition of the diet, in particular the forage to concentrate ratio, the amount of oil added to the feed and its content in more or less saturated fatty acids.

CONCLUSIONS

1. *In vitro* digestibility of forages is decreased when pH is reduced in cultures of mixed ruminal microbes by changing the buffer composition of the medium, by adding substrates rich in rapidly fermentable carbohydrates or by inoculating the cultures with ruminal fluid from animals fed high-concentrate rations. This decrease in digestibility is directly related to the forage fibre content.
2. When ruminal pH is reduced from 6.9 to 6.4, feed digestibility and the production of fermentation gas and of short-chain fatty acids (in particular acetic acid) are decreased. Feed protein degradation is also decreased, producing less ammonia and short chain iso-acids, with no effect on the synthesis of microbial protein. With this decrease in pH there are no changes in other fermentation end-products, such as methane, propionic, butyric or lactic acids, and no significant differences in the hydrogenation and profile of long-chain fatty acids in the rumen digesta.
3. When a high concentrate diet is digested in the rumen, there is an increase in the production of fermentation gas, in the output of some short-chain fatty acids (butyric, valeric, caproic and iso-acids), lactic acid and ammonia, as well as in the microbial protein synthesis. However, methane production or efficiency of microbial protein synthesis are unaffected. Increasing the inclusion of concentrates in the diet increases the hydrogenation of α -linolenic acid reducing that of oleic acid, with no effect on that of linoleic acid. As a result of these changes, there are significant variations in the fatty acid profile in the rumen digesta, so that the relative proportions of stearic acid and conjugated linoleic acid (C18:2 *c9t11*) are greater with a high forage diet.

4. The ruminal fermentation pattern changes by adding 6 % olive, sunflower or linseed oil to dairy sheep diets, with a decrease in the acetate to propionate ratio and a reduction in methane and ammonia production, without affecting the efficiency of microbial protein synthesis. The addition of these oils decreases the amylolytic and cellulolytic activities in the fermenters, especially with linseed oil. The addition of olive, sunflower or linseed oils decreases the hydrogenation of the long chain fatty acids in the rumen, affecting the saturation of each fatty acid to a different extent depending on the composition of unsaturated fatty acids of each oil used as a supplement. Thus, the fatty acid profile in the ruminal digesta depends on the fatty acid composition of the oil added to the feed and on the extent to which the hydrogenation of oleic, linoleic and α -linolenic acids is affected by each supplemental oil.

5. The addition of 1 % fish or algae oil to a dairy sheep diet already supplemented with 2 % sunflower oil does not affect feed digestibility, but gives rise to a significant reduction in methane production from ruminal fermentation. In addition, there are changes in the fermentation pattern, with a decrease in the acetate to propionate ratio and an increased production of total volatile fatty acids and lactic acid, with no effect on the microbial protein synthesis. The addition of these oils does not affect the cellulolytic activity in the fermenters, with a slight decrease in the fermentation rate of starch. The combined addition of sunflower oil with either fish or algae oil to the diet decreases the hydrogenation of the long chain fatty acids in the rumen, with a different effect on the saturation of each fatty acid. Consequently, there are changes in the fatty acid profile in the rumen digesta in response to the addition of fish or algae oils, including an increase in the relative proportion of conjugated linoleic acid (C18:2 c9t11).

6. Lipid supplementation of diets for high-producing ruminants affects both the microbial fermentation and the long-chain fatty acid hydrogenation in the rumen. The most consistent effects are a decrease in methane production and a reduction in the hydrogenation of unsaturated fatty acids, affecting the oleic, linoleic and α -linolenic acids to a variable extent and determining the synthesis of certain intermediates such as vaccenic or conjugated linoleic acid that reach the abomasum and will be absorbed in the small intestine. The extent of these effects is variable and depends on the composition of the diet, in particular the forage to concentrate ratio, the amount of oil added to the feed and its content in more or less saturated fatty acids.

ANEXOS

ANEXO 1

AUTORES: VARGAS, J.E., LÓPEZ, S., YÁÑEZ-RUIZ, D.R., FERNÁNDEZ, M., HERVÁS, G., MANTECÓN, A.R. y GONZÁLEZ, J.S.

TÍTULO: Efecto de la adición de aceites vegetales al pienso sobre la actividad fermentativa en el rumen.

REF.: ITEA, 28 (Vol. extra) Tomo I: 123-125. (2007).

ANEXO 2

AUTORES: VARGAS, J.E., LÓPEZ, S., GIRÁLDEZ, F.J. y GONZÁLEZ, J.S.

TÍTULO: Efecto del pH en el medio de cultivo sobre la digestibilidad *in vitro* de los forrajes.

REF.: ITEA, 28 (Vol. extra) Tomo I: 237-239. (2007).

ANEXO 3

AUTORES: VARGAS, J.E., ANDRÉS, S., YÁÑEZ-RUIZ, D.R. y LÓPEZ, S.

TÍTULO: Efecto de la adición de aceites vegetales al sustrato de fermentación sobre las comunidades de bacterias ruminales en cultivos continuos (Rusitec).

REF.: AIDA. XIII Jornadas sobre Producción Animal, Tomo 1: 775-777. (2009).

ANEXO 4

AUTORES: VARGAS, J.E., LÓPEZ, S., GIRÁLDEZ, F.J. and GONZÁLEZ, J.S.

TÍTULO: *In vitro* forage digestibility under suboptimal microbial inoculum and culture media pH conditions.

REF.: En: ***Nutritional and foraging ecology of sheep and goats*** (eds. T.G. Papachristou, Z.M. Parissi, H. Ben Salem & P. Morand-Fehr). ***Options Méditerranéennes (Series A: Mediterranean Seminars)***, No. 85: 291-296. (2009).

ANEXO 5

AUTORES: ANDRÉS, S., VARGAS, J.E., LÓPEZ-FERRERAS, L., YÁÑEZ-RUIZ, D.R. and LÓPEZ, S.

TÍTULO: Fish and algal oils induce changes in rumen bacterial communities in Rusitec fermenters.

REF.: En: ***Gut Microbiology: New Insights into Gut Microbial Ecosystems*** – Book of Abstracts of Rowett-INRA 2010 - 7th joint symposium on gut microbiology organized by the Rowett Institute of Nutrition and Health and l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). pp. 123. Rowett-INRA, Aberdeen. (2010)

ANEXO 6

AUTORES: VARGAS, J.E., ANDRÉS, S., YÁÑEZ-RUIZ, D.R., LÓPEZ-FERRERAS, L. and LÓPEZ, S.

TÍTULO: Effects of forage to concentrate ratio in the diet and pH on ruminal fermentation in Rusitec fermenters.

REF.: ***Advances in Animal Biosciences / Proceedings of the 8th International Symposium on the Nutrition of Herbivores***: 434. (2011).

ANEXO 7

AUTORES: VARGAS, J.E., ANDRÉS, S., YÁÑEZ-RUIZ, D.R. and LÓPEZ, S.

TÍTULO: The effect of olive, sunflower or linseed oils on the fermentation pattern and methane production in the rumen simulating technique.

REF.: En: ***Challenging strategies to promote the sheep and goat sector in the current global context*** (eds. M.J. Ranilla, M.D. Carro, H. Bem Salem & P. Morand-Fehr). ***Options Méditerranéennes (Série A: Mediterranean Seminars)***, No. **99**: 163-168. (2011).

ANEXO 8

AUTORES: VARGAS, J.E., ANDRÉS, S., SNELLING, T.J., LÓPEZ-FERRERAS, L., YÁÑEZ-RUIZ, D.R., GARCÍA-ESTRADA, C. and LÓPEZ, S.

TÍTULO: Effect of sunflower and marine oils on ruminal microbiota, in vitro fermentation and digesta fatty acid profile.

REF.: ***Frontiers in Microbiology***, **8**: no. 1124. (2017). DOI:10.3389/fmicb.2017.01124

ANEXO 1

**ASOCIACION
INTERPROFESIONAL PARA EL
DESARROLLO AGRARIO
(AIDA)**

XXXVIII JORNADAS DE ESTUDIO

XII JORNADAS

SOBRE PRODUCCION ANIMAL

16 y 17 de mayo de 2007

Zaragoza

TOMO I

COLABORAN:

Gobierno de Aragón: Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (IAMZ)
Caja de Ahorros de la Inmaculada (CAI)
Universidad de Zaragoza
Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA)

ITEA

Información Técnica Económica Agraria
Revista de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario

SECRETARIA DE LAS JORNADAS:

BEGOÑA PANEA DOBLADO

COORDINADORES DE SECCION:

Genética: JORGE HUGO CALVODO

Patología Animal: RAÚL CARLOS MAINAR JAIME

Nutrición-Alimentación Animal: MARGALIDA JOY TORRENS

Sistemas Ganaderos-Economía y gestión: ISABEL CASASÚS PUEYO

Calidad de los Productos: M^a ANGELES LATORRE GÓRRIZ

Reproducción: ALBINA SANZ PASCUA

Secretaría: Mercedes Ferruz Andrés

Mayo 2007 Volumen Extra Número 28 tomo I	DIRECCION Y REDACCION Montañana, 930 - Apartado 727 50080 ZARAGOZA (ESPAÑA)	Depósito legal: Z-577-82 ISSN: 1130-6009 INO Reproducciones, S.A. 50016 Zaragoza
--	--	---

**Prohibida toda reproducción total o parcial sin autorización expresa de la
Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario**

**ITEA no se solidariza necesariamente con las opiniones en los artículos firmados
que publica, cuya responsabilidad corresponde a los autores**

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE ACEITES VEGETALES AL PIENSO SOBRE LA ACTIVIDAD FERMENTATIVA EN EL RUMEN¹

Vargas¹, J.E., López, S., Yañez-Ruiz², D.R., Fernández, M.
Hervás³, G., Mantecón³, A.R., González, J.S.

Dpto. Producción Animal. Universidad de León. 24071 León. e-mail: s.lopez@unileon.es

¹ Universidad de Caldas, Colombia

² University of Wales, Institute of Rural Science, Aberystwyth, Reino Unido

³ Estación Agrícola Experimental (CSIC), Finca Marzanas, 24346-Grulleros
Unidad Asociada al CSIC Grupo de Nutrición-Practicultura del Departamento de Producción Animal de la Universidad de León a través de la Estación Agrícola Experimental de León

INTRODUCCION

La inclusión de lípidos en los piensos para los animales rumiantes ha cobrado un considerable interés en los últimos años, como un medio para aumentar la concentración energética del alimento que permita incrementar la ingestión de energía y, consecuentemente, alcanzar elevados niveles de producción. Además, mediante la adición de aceites ricos en ácidos grasos (AG) poliinsaturados es posible aumentar el contenido de ácido linoleico conjugado (ALC) en la carne y la leche, ya que este compuesto es un intermediario en la biohidrogenación ruminal de los AG insaturados. El ALC es considerado un nutriente funcional por los efectos beneficiosos que sobre la salud humana se le han atribuido (Park y Pariza, 2007). Por todo ello, la inclusión en los piensos de aceites vegetales ricos en AG poliinsaturados (girasol y lino), o de aceites de pescado o extraídos de algas marinas podría tener un efecto favorable para lograr este objetivo (De La Torre *et al.*, 2006; Collomb *et al.*, 2006; Dewhurst *et al.*, 2006).

Las técnicas de simulación de la fermentación ruminal (mediante cultivos continuos como el RUSITEC) y de producción de gas constituyen dos de los procedimientos experimentales *in vitro* más utilizados en la actualidad para el estudio de los procesos de fermentación ruminal, pues permiten el control de las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la fermentación y de los factores de variación que la afectan (Rymer *et al.*, 2005). El fermentador RUSITEC (también llamado rumen artificial) permite simular el proceso de fermentación ruminal durante periodos de tiempo relativamente largos. La técnica de producción de gas se ha utilizado para estudiar la cinética de fermentación, lo que permite estimar los parámetros de degradación de los alimentos o establecer diferencias entre distintos inóculos en cuanto a su actividad fermentativa.

El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto de la adición de varios aceites vegetales (oliva, girasol y lino) al pienso sobre la actividad fermentativa en el rumen.

MATERIAL Y METODOS

Los tratamientos evaluados estuvieron determinados por la fuente de aceite añadida al pienso: control (pienso sin aceite), oliva (igual al control más un 6% de aceite de oliva), girasol (igual al control más un 6% de aceite de girasol) y lino (igual al control más un 6% de aceite de lino). El pienso utilizado fue una mezcla *unifeed* preparada con los siguientes ingredientes: 25% maíz, 15% cebada, 20% soja, 20% alfalfa deshidratada, 9% pulpa de remolacha, 6% melazas, 1,5% bicarbonato y 3,5% corrector. Su composición química (por kg de MS) fue: 926 g de MO, 180 g de proteína bruta y 209 g de FDN.

El experimento se inició con una prueba en el fermentador RUSITEC con 16 vasijas de fermentación (4 vasijas por tratamiento). Esta prueba tuvo una duración total de tres semanas. Diariamente, en cada vasija se introdujo una bolsa de nailon que contenía 15 g del pienso correspondiente, al tiempo que se retiraba otra bolsa que había permanecido en la vasija durante 48 h. La rutina de trabajo con los fermentadores RUSITEC ha sido descrita

¹ Proyecto financiado por la CICYT AGL2005-04760-C02-02

en detalle por Carro *et al.* (1999). Una vez finalizada la prueba RUSITEC, el contenido de cada vasija se utilizó como inóculo para llevar a cabo un ensayo de cinética de fermentación mediante la técnica de la producción de gas. Este ensayo se realizó en viales de 120-ml de capacidad en los que se había pesado previamente 500 mg de sustrato. Los sustratos utilizados fueron: celulosa, almidón y el mismo pienso (molido a 1 mm en molino tipo Culati) que había sido utilizado en la prueba RUSITEC. Con el contenido líquido de cada vasija RUSITEC se inocularon un total de ocho viales, dos con cada uno de los sustratos de incubación y otros dos sin sustrato (blancos). Para ello, cada inóculo se mantuvo en las vasijas RUSITEC a 39°C y se homogenizó inmediatamente antes de que en cada vial se dosificaran, en condiciones de anaerobiosis, 50 ml del contenido de la vasija correspondiente utilizando una bomba peristáltica. Los viales se cerraron con tapones de caucho y se precintaron con cápsulas de aluminio. Luego, los viales se agitaron y se colocaron dentro de una estufa de cultivo que se mantuvo a una temperatura de 39°C.

Al cabo de 4, 7, 10, 13, 17, 21, 25, 30, 35, 45, 57, 69, 105, 117 y 132 horas de incubación se midió la producción de gas fermentación a partir del aumento de presión en el espacio de cabeza de los viales, utilizando un transductor de presión. Para el análisis de resultados, los datos de producción acumulada de gas (corregidos para los blancos) se ajustaron (individualmente para cada vial) al modelo exponencial $G = A (1 - e^{-c(t-L)})$. Posteriormente, se usaron las estimaciones de los parámetros para el cálculo de la producción de gas (ml) a las 24 (G24), 48 (G48) y 96 h (G96) en el caso del almidón y el pienso, y a las 30 (G30), 48 (G48) y 96 h (G96) en el caso de la celulosa. Finalmente, tanto los datos de producción de gas estimada como los valores de los parámetros A, c y L de la ecuación mencionada se sometieron a un análisis de varianza a una vía, con el tipo de aceite añadido al pienso en la prueba RUSITEC como único factor de variación.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los aceites empleados se caracterizan por sus contenidos en ácido oleico (oliva), linoleico (girasol) y linolénico (lino). En relación con los parámetros de degradación del pienso, en la Tabla 1 se observa que la producción asintótica de gas (A) y las producciones de gas a las 24, 48 y 96 h fueron mayores para el tratamiento control y menores cuando el inóculo procedía de las vasijas en las que se había incubado el pienso con aceite de lino. No hubo diferencias significativas entre tratamientos ni en el ritmo de fermentación (c) ni en el tiempo de retraso (L).

Tabla 1. Efecto del inóculo sobre la cinética de fermentación in vitro del pienso

Tratamiento	A ml	c h ⁻¹	L Horas	Gas 24 h ml	Gas 48 h ml	Gas 96 h ml
Control	311 a	0.044	2.7	189 a	268 a	306 a
Oliva	291 b	0.046	2.5	184 ab	256 b	287 b
Girasol	287 b	0.045	2.6	176 b	249 b	282 bc
Lino	277 b	0.042	2.5	165 c	236 c	271 c
EED	8.2	0.0016	0.11	4.4	6.0	7.6
P ≤	0.003	0.140	0.105	0.001	0.001	0.001

La tendencia fue similar en el caso del almidón (actividad amilolítica del inóculo), si bien se observaron diferencias en el ritmo de fermentación del almidón que fue más rápido con el inóculo control y menor cuando los inóculos procedían de las vasijas en las que se incubó el pienso con aceites de girasol y de lino (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del inóculo sobre la cinética de fermentación in vitro del almidón

Tratamiento	A ml	c h ⁻¹	L Horas	Gas 24 h ml	Gas 48 h ml	Gas 96 h ml
Control	311	0.059 a	4.6 a	210 a	285 a	309
Oliva	310	0.043 b	2.1 b	191 b	268 b	305
Girasol	301	0.039 c	2.2 b	171 c	250 c	293
Lino	306	0.039 c	2.4 b	172 c	252 c	296
EED	11.3	0.0020	0.29	4.7	7.3	10.1
P ≤	0.837	0.001	0.001	0.001	0.001	0.394

Las diferencias entre tratamientos experimentales fueron más acusadas en lo que se refiere a la cinética de fermentación de la celulosa (Tabla 3), como un indicador de la actividad celulolítica de la población microbiana de los cultivos continuos mantenidos en las vasijas RUSITEC en las que se incubó uno u otro pienso. Las producciones de gas fueron más elevadas, el ritmo de fermentación más rápido y el tiempo de retraso más corto en el tratamiento control, situándose en el otro extremo los inóculos procedentes de vasijas en las que se incubó el pienso con aceite de girasol o de lino.

Tabla 3. Efecto del inóculo sobre la cinética de fermentación in vitro de la celulosa

Tratamiento	A ml	c h ⁻¹	L Horas	Gas 30 h ml	Gas 48 h ml	Gas 96 h ml
Control	352 a	0.018 a	9.8 c	108 a	176 a	278 a
Oliva	300 b	0.017 a	13.7 b	68 b	130 b	224 b
Girasol	278 c	0.016 a	16.7 a	52 c	110 c	201 c
Lino	271 c	0.014 b	15.2 ab	49 c	100 c	184 d
EED	12.4	0.0010	1.36	5.1	5.3	8.0
P ≤	0.001	0.006	0.001	0.001	0.001	0.001

La adición de aceites vegetales al pienso reduciría las actividades amilolítica y, en mayor medida, celulolítica de la población microbiana ruminal, siendo este efecto más acusado con aceites ricos en AG poliinsaturados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carro, M.D.; S. López; C. Valdés; F.J. Ovejero. 1999. Effect of DL-malate on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen simulation technique (RUSITEC). *Animal Feed Science and Technology*, **79**: 279-288.
- Collomb, M.; A. Schmid; R. Sieber; D. Wechsler; E.L. Ryhanen. 2006. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. *International Dairy Journal*, **16**: 1347-1361.
- De La Torre, A.; D. Gruffat; D. Durand; D. Micol; A. Peyron; V. Scislowski; D. Bauchart. 2006. Factors influencing proportion and composition of CLA in beef. *Meat Science*, **73**: 258-268.
- Dewhurst, R.J.; K.J. Shingfield; M.R.F. Lee; N.D. Scollan. 2006. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology*, **131**: 168-206.
- Park, Y.; Pariza, M.W. 2007. Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). *Food Research International*, **40**: 311-323.
- Rymer, C.; J.A. Huntington; B.A. Williams; D.I. Givens. 2005. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, **123-124**: 9-30.

ANEXO 2

**ASOCIACION
INTERPROFESIONAL PARA EL
DESARROLLO AGRARIO
(AIDA)**

XXXVIII JORNADAS DE ESTUDIO

XII JORNADAS

SOBRE PRODUCCION ANIMAL

16 y 17 de mayo de 2007

Zaragoza

TOMO I

COLABORAN:

Gobierno de Aragón: Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (IAMZ)
Caja de Ahorros de la Inmaculada (CAI)
Universidad de Zaragoza
Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA)

ITEA

Información Técnica Económica Agraria
Revista de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario

SECRETARIA DE LAS JORNADAS:

BEGOÑA PANEA DOBLADO

COORDINADORES DE SECCION:

Genética: JORGE HUGO CALVODO

Patología Animal: RAÚL CARLOS MAINAR JAIME

Nutrición-Alimentación Animal: MARGALIDA JOY TORRENS

Sistemas Ganaderos-Economía y gestión: ISABEL CASASÚS PUEYO

Calidad de los Productos: M^a ANGELES LATORRE GÓRRIZ

Reproducción: ALBINA SANZ PASCUA

Secretaría: Mercedes Ferruz Andrés

Mayo 2007 Volumen Extra Número 28 tomo I	DIRECCION Y REDACCION Montañana, 930 - Apartado 727 50080 ZARAGOZA (ESPAÑA)	Depósito legal: Z-577-82 ISSN: 1130-6009 INO Reproducciones, S.A. 50016 Zaragoza
--	--	---

**Prohibida toda reproducción total o parcial sin autorización expresa de la
Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario**

**ITEA no se solidariza necesariamente con las opiniones en los artículos firmados
que publica, cuya responsabilidad corresponde a los autores**

EFFECTO DEL pH EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE LOS FORRAJES¹

Vargas¹, J.E., López, S., Giráldez², F.J., González, J. S.

Dpto. Producción Animal. Universidad de León. 24071 León. e-mail: s.lopez@unileon.es

¹ Departamento Sistemas de Producción, Universidad de Caldas, Colombia

² Estación Agrícola Experimental (CSIC), Finca Marzanas, 24346-Grulleros

Unidad Asociada al CSIC Grupo de Nutrición-Practicultura del Departamento de Producción Animal de la Universidad de León a través de la Estación Agrícola Experimental de León

INTRODUCCIÓN

El pH de la digesta en el rumen es uno de los factores que influye de manera más significativa sobre la población microbiana y el patrón de fermentación ruminal (Lana *et al.*, 1998) y, consecuentemente, sobre la degradación de la pared celular vegetal. La producción de ácidos grasos de cadena corta tiende a reducir el pH, mientras que su absorción a través de las paredes del rumen y la secreción de saliva con una elevada capacidad amortiguadora son los principales mecanismos para neutralizar dicho efecto y mantener el pH dentro de un rango estrecho. El pH puede variar en función del tipo de dieta que ingiere el animal.

Con los métodos *in vitro* para el estudio de la fermentación ruminal es posible un control preciso de las condiciones de incubación. Sin embargo, el estudio del efecto del pH en condiciones *in vitro* (Grant y Mertens, 1992) plantea ciertas dificultades, ya que para poder mantener cultivos de microorganismos ruminales es preciso que en el medio de cultivo se incluya una disolución tampón que amortigüe las variaciones de pH (Menke y Steingass, 1988) provocadas por la acumulación de los ácidos grasos de cadena corta.

El objetivo de este trabajo de investigación fue estudiar los efectos de la adición de diversos sustratos fermentables (cebada, heno) o distintas disoluciones amortiguadoras sobre el pH del medio de cultivo y sobre la digestibilidad *in vitro* de varios forrajes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para las incubaciones se utilizó líquido ruminal obtenido de cuatro ovejas adultas provistas de cánula ruminal y alimentadas con heno de alfalfa. La recogida de muestras de digesta ruminal se realizó inmediatamente antes de la administración del alimento. El líquido ruminal fue filtrado y mezclado con el medio de cultivo en una proporción de 1:4 (v/v). El medio de cultivo empleado en el tratamiento control fue el descrito por Menke y Steingass (1988) que consiste en una mezcla de sales minerales en una disolución amortiguadora de bicarbonato (4 g (NH₄)HCO₃ y 35 g NaHCO₃ por litro de agua destilada). Esta disolución se añadió al medio de cultivo de forma que en la mezcla final de líquido ruminal diluido su proporción fue de 190 mL/L. La preparación del medio de cultivo y la adición de líquido ruminal se realizaron en condiciones de anaerobiosis.

Para la determinación de la digestibilidad *in vitro* se utilizó el procedimiento *in sacco* ANKOM. Las muestras se incubaron dentro de bolsitas confeccionadas con material sintético poroso (ANKOM F57). En cada bolsita se pesaron 250 mg de muestra. Las bolsitas se introdujeron en recipientes de vidrio de 4 L de capacidad (22 bolsitas en cada recipiente), añadiendo 2 L de líquido ruminal diluido. Los recipientes fueron introducidos en un incubador con agitación continua, manteniendo una temperatura constante de 39° C. Tras 24 h de incubación, las vasijas se introdujeron en un baño de hielo para interrumpir la fermentación. Posteriormente, se extrajo el líquido ruminal de cada recipiente, y las bolsitas fueron lavadas y aclaradas con agua destilada. A continuación, y utilizando el analizador de fibra de ANKOM, las bolsitas se sometieron a una extracción con detergente neutro a 100° C durante 1 h. Se realizaron varios aclarados con agua destilada y una final con acetona. Finalmente, las bolsitas se secaron en estufa a 65° C durante 48 h y, una vez pesadas, se determinó el residuo de incubación para calcular la digestibilidad *in vitro*.

¹ Proyecto de la Unión Europea REPLACE FP6-FOOD-CT-2004-506487

En todas las incubaciones se utilizaron cuatro alimentos comúnmente empleados en la alimentación de los rumiantes y que se caracterizan por poseer paredes celulares muy diversas tanto en su composición como en su estructura. Los cuatro forrajes utilizados fueron: heno de alfalfa (544 g FND/kg MS), heno de hierba (640 g FND/kg MS), paja de cebada (759 g FND/kg MS) y pulpa de remolacha (729 g FND/kg MS). En cada incubación, cada uno de los alimentos se incubó por quintuplicado.

Ensayo 1: En este ensayo las variaciones en el pH se provocaron añadiendo al medio de cultivo sustratos fermentables. La prueba se diseñó con tres tratamientos experimentales (un control y dos tratamientos), de forma que en cada tanda de incubación se utilizaron tres vasijas. La vasija control llevaba líquido ruminal diluido, mientras que en las otras vasijas se añadía directamente (no introducido en bolsitas) 1 g de harina de cebada o 1 g de heno de hierba finalmente molidos. En todos los casos se utilizó el medio de cultivo genérico descrito anteriormente, con la disolución amortiguadora de bicarbonato. La incubación se repitió en dos semanas distintas, de forma que para tratamiento se dispuso de 10 repeticiones (5 bolsitas en cada incubación x dos incubaciones).

Ensayo 2: En este ensayo las variaciones en el pH se provocaron sustituyendo la disolución amortiguadora del medio de cultivo por disoluciones de Mcllvaine con distintas proporciones de Na_2HPO_4 y ácido cítrico. La prueba se diseñó con cinco tratamientos experimentales. La vasija control llevaba líquido ruminal diluido con la disolución amortiguadora de bicarbonato. En las otras vasijas, al preparar el medio de cultivo se sustituía dicha disolución amortiguadora por el mismo volumen de una de las siguientes disoluciones de Mcllvaine (MI): MI180, MI360, MI420 y MI480, que contenían 180, 360, 420 y 480 ml/L de ácido cítrico y 820, 640, 580 y 520 ml/L de Na_2HPO_4 , respectivamente. En este caso se realizaron dos incubaciones, en la primera se incluyeron los tratamientos Control, MI180, y MI360, y en la segunda los tratamientos Control, MI180, MI420 y MI480.

Los resultados se analizaron mediante ANOVA con la tanda de incubación como factor de bloque y el tratamiento experimental como principal factor de variación. La comparación múltiple entre medias se realizó mediante el test de Bonferroni.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran los resultados del primer ensayo.

Tabla 1. Efecto de la adición de cebada o de heno al medio de cultivo sobre el pH y la digestibilidad *in vitro* de varios forrajes.

	pH		Digestibilidad <i>in vitro</i>			
	Inicial	Final	Heno de alfalfa	Heno de hierba	Paja de cebada	Pulpa de remolacha
Control	6,97	7,00	0,496	0,446 a	0,378 a	0,709 a
Heno	7,00	6,70	0,495	0,436 a	0,371 a	0,706 a
Cebada	7,00	6,60	0,485	0,408 b	0,329 b	0,637 b
ESD			0,0120	0,0107	0,0113	0,0180
P =			0,491	0,002	<0,001	<0,001

^{ab} Medias con superíndices distintos en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

EED = Error estándar de la diferencia. P = nivel de significación estadística

La fermentación tanto de la cebada como del heno provocó un descenso apreciable del pH final en el medio de cultivo. A pesar de este descenso en el pH final del medio, no hubo diferencias entre tratamientos en la digestibilidad *in vitro* del heno de alfalfa. Por otra parte, al añadir cebada al medio de cultivo se observó una disminución significativa en la digestibilidad *in vitro* de los otros tres sustratos con respecto al control. Sin embargo, esta disminución no se observó cuando se añadió un sustrato fibroso (heno). Estos resultados parecen indicar que tanto el pH como el tipo de sustrato (almidón, carbohidratos estructurales) afectan a la población microbiana en el medio de cultivo, al patrón de fermentación y a la digestibilidad de los sustratos.

Los cambios del pH del medio provocados al utilizar distintas combinaciones del buffer citrato:fosfato de McIlvaine tuvieron un efecto significativo sobre la digestibilidad *in vitro* de los forrajes (Tabla 2). Con todas las disoluciones el pH se mantuvo relativamente constante (variaciones de una décima) durante las 24 h de incubación. En todos los casos, el descenso del pH provocó un descenso lineal de la digestibilidad *in vitro*, siendo este descenso mas marcado en el caso de la paja de cebada y de la pulpa de remolacha.

Tabla 2. Efecto de la adición de distintas disoluciones amortiguadoras de McIlvaine al medio de cultivo sobre el pH y la digestibilidad *in vitro* de varios forrajes.

	pH		Digestibilidad <i>in vitro</i>			
	Inicial	Final	Heno de alfalfa	Heno de hierba	Paja de cebada	Pulpa de remolacha
Control	7,00	7,05	0,507 a	0,451 a	0,407 a	0,702 a
Buffer MI180	6,55	6,45	0,525 a	0,428 ab	0,286 b	0,545 b
Buffer MI360	6,30	6,40	0,520 a	0,402 b	0,284 b	0,468 c
Buffer MI420	5,90	6,00	0,451 b	0,314 c	0,152 c	0,407 d
Buffer MI480	5,80	5,90	0,450 b	0,320 c	0,142 c	0,406 d
EED			0,0180	0,0134	0,0190	0,0175
P =			0,013	<0,001	<0,001	<0,001

^{abcd} Medias con superíndices distintos en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

EED = Error estándar de la diferencia. P = nivel de significación estadística

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GRANT, R.J. & MERTENS, D.R. 1992. Development of buffer systems for pH control and evaluation of pH effects on fiber digestion *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, **75**: 1581-1587.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. & VAN AMBURGH, M.E. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *Journal of Animal Science*, **76**: 2190-2196.
- MENKE, K.H. & STEINGASS, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, **28**: 7-55.

ANEXO 3

AIDA

Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario

Tomo II (2009)

XIII Jornadas sobre producción animal

ASOCIACION INTERPROFESIONAL PARA EL DESARROLLO AGRARIO (AIDA)

XXXIX JORNADAS DE ESTUDIO

XIII JORNADAS

SOBRE PRODUCCION ANIMAL

12 y 13 de mayo de 2009

Zaragoza

TOMO II

COLABORAN:

Gobierno de Aragón: Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad
Gobierno de Aragón: Departamento de Agricultura
Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA)
Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (IAMZ)
Fundación Aula Dei, Parque Científico Tecnológico
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria (INIA)

Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario

Título:

XIII Jornadas sobre Producción Animal

Edita:

Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario

Textos:

Autores

Colección:

Congresos y Jornadas

Serie:

Producción Animal

Coordinadores:

Margalida Joy Torrens

Jorge H. Calvo Costa

Carlos Calvete Margolles

María Ángeles Latorre Górriz

Isabel Casasús Pueyo

Begoña Panea Doblao

Albina Sanz Pascua

Joaquín Balcells Teres

Foto portada:

José Antonio Rodríguez-Sánchez

XIII Jornadas sobre Producción Animal Tomo II	DIRECCION Y REDACCION Montañana, 930 - Apartado 727 50080 ZARAGOZA (ESPAÑA)	ISBN: En tramitación Depósito legal: Z-1919-2009 INO Reproducciones, S.A. 50016 Zaragoza
---	--	---

**Prohibida toda reproducción total o parcial sin autorización expresa de la
Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario**

**AIDA no se solidariza necesariamente con las opiniones en los artículos firmados
que publica, cuya responsabilidad corresponde a los autores**

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE ACEITES VEGETALES AL SUSTRATO DE FERMENTACIÓN SOBRE LAS COMUNIDADES DE BACTERIAS RUMINALES EN CULTIVOS CONTINUOS (RUSITEC)

Vargas^{1,2}, J.E., Andrés¹, S., Yáñez Ruiz³, D.R., López^{1*}, S.

¹ Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), 24346 León.

* s.lopez@unileon.es. ² Universidad de Caldas, Colombia.

³ Estación Experimental del Zaidín (CSIC), 18008 Granada

INTRODUCCIÓN

La inclusión de aceites en los piensos destinados a rumiantes puede incrementar el contenido de ácido linoleico conjugado en la carne y de la leche. Por esta razón, la adición de aceites en la ración de los rumiantes se está valorando como estrategia para incrementar la calidad del producto final que llega al consumidor. No obstante, el efecto inhibitor que los lípidos tienen sobre la comunidad microbiana del rumen y sobre su actividad fermentativa ha de ser evaluado convenientemente antes de ofrecer ningún tipo de recomendación al sector productivo. En este sentido, las técnicas de biología molecular permiten investigar los cambios que se producen en las comunidades microbianas del rumen en respuesta a diversos factores de variación.

El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar el efecto de la adición de varios aceites de origen vegetal (oliva, girasol y lino) al pienso sobre la diversidad de la comunidad bacteriana ruminal en fermentadores continuos (Rusitec), utilizando la técnica T-RFLP.

MATERIAL Y MÉTODOS

El pienso utilizado fue una mezcla *unifeed* compuesta por maíz (25%), cebada (15%), soja (20%), alfalfa deshidratada (20%), pulpa de remolacha (9%), melaza (6%), bicarbonato (1,5%) y corrector (3,5%). Los tratamientos consistieron en distintos tipos de aceite vegetal añadidos al 6% al pienso control (pienso sin aceite, **C**), que fueron los siguientes; oliva (**C** + aceite de oliva, **O**), girasol (**C** + aceite de girasol, **G**) y lino (**C** + aceite de lino, **L**). El experimento se realizó con 16 vasijas de fermentación Rusitec (4 vasijas por tratamiento) y tuvo una duración total de 3 semanas (Carro et al., 1999). El último día de la prueba se tomó una muestra compuesta por 1,5 g (materia fresca) del residuo de la bolsa incubada durante 48h, 1,5 g del residuo de la bolsa incubada 24h y 30 ml de sobrenadante de cada vasija. Estas tres fracciones se mezclaron y la muestra resultante se consideró representativa de la digesta y se destinó a la extracción de DNA microbiano con el kit QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (Qiagen Ltd, UK). Tras la extracción se amplificó un fragmento de ADN ribosómico (fracción 16S) mediante PCR empleando cebadores específicos y universales para bacterias, uno de ellos marcado con fluorescencia (fluorocromo carboxifluoresceína 6, FAM) en el extremo 5' (FAM-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; CTTGTACACACCGCCCGT). Seguidamente el producto resultante de la PCR se purificó con el Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). A continuación se cuantificó el DNA y de cada muestra se tomaron 100 ng que fueron sometidos a una digestión a 37° C durante 12h con la enzima de restricción Hha I. El ADN se precipitó con etanol y posteriormente se resuspendió en 10 µL de Tween20 al 0.1% que contenía un patrón de tamaño de fragmentos de entre 60 y 400 pb marcado con el fluoróforo ET-ROX. Los fragmentos resultantes de esta digestión se analizaron en un secuenciador de capilares Megabace 500 (GE Healthcare) con un voltaje de 10 kV durante 70 min. Por último, para cada muestra se calculó la altura relativa de los picos obtenidos con el programa GeneMarker[®] y se realizó un análisis de componentes principales (PCA) a partir de estos valores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El PCA de la matriz de datos con las alturas relativas de los picos detectados en cada muestra evidenció claras diferencias en las comunidades bacterianas de las vasijas control

(pienso sin aceite) con respecto a aquéllas que contenían pienso con aceites (Figura 1). Además, la información obtenida mediante T-RFLP permitió clasificar en *clusters* diferentes las muestras tratadas con distintos tipos de aceite (Figura 1). No obstante, pequeñas variaciones en las condiciones de cada uno de los dos fermentadores Rusitec empleados en este estudio (8 vasijas por Rusitec con 2 vasijas por tratamiento en cada uno de ellos) pudieron ocasionar diferencias más importantes en las comunidades bacterianas que las debidas al tipo de aceite añadido, lo que explicaría que en la Figura 1 se observen dos *clusters* diferentes para cada tipo de aceite.

Figura 1. Discriminación obtenida mediante PCA de las alturas relativas de los picos de T-RFLP

Figura 2. Fragmentos (pb) cuya altura relativa posibilita la discriminación entre muestras de la Figura 1

En todo caso, el PCA no solo permite realizar una discriminación adecuada de las muestras en función de las alturas relativas de los picos detectados mediante T-RFLP (Figura 1), sino que, además, facilita la identificación de los picos que, con mayor probabilidad, determinan dicha discriminación. La Figura 2 ilustra la importancia relativa que cada una de las variables (altura relativa de los picos) tiene en el cálculo de los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2). Por tanto, las variables (picos) más excéntricas serán aquéllas que resultan más determinantes en la discriminación de las muestras mediante PCA, mientras que aquéllas próximas al centro pueden ser consideradas como menos relevantes.

Por otra parte, la herramienta tap-tRFLP del software Ribosomal Data Project (RDP) permite realizar una asignación teórica de la especie o género bacteriano a cada uno de estos picos (Castillo et al., 2007) que resultan determinantes en la discriminación de las muestras (Figura 2). Esto es posible gracias a las secuencias introducidas en esta base de datos por otros autores. En nuestro caso, los fragmentos (pb) identificados en la Figura 2 como determinantes en la discriminación de las muestras permitieron identificar algunas bacterias ruminales compatibles a partir del programa RDP (Tabla 1). Gracias a esta información es posible sugerir que algunas bacterias de los géneros *Prevotella* y *Ruminobacter* podrían resultar favorecidas con la adición de aceites al pienso, dado que la altura relativa de los fragmentos correspondientes a estos géneros aumenta en las muestras tratadas con aceites con respecto a las del pienso control (sin aceite). Este hecho parece ser especialmente destacable en el caso de *Ruminobacter*, ya que el fragmento compatible con este género (217 pb) ni siquiera pudo ser detectado en las muestras control (Tabla 1).

Por el contrario, otros géneros que han sido relacionados con la hidrogenación de los ácidos grasos y, por tanto, con el metabolismo lipídico a nivel ruminal, como son *Butyrivibrio* y *Pseudobutyrvibrio* (Paillard et al., 2007), parecen más sensibles a la adición de aceites al pienso. Así parece constatarlo el hecho de que la altura relativa media del pico compatible con estos géneros (189 pb) se reduzca a la mitad en las muestras tratadas con aceite con respecto a las del pienso control.

Tabla 1. Bacterias ruminales compatibles según Ribosomal Data Project (RDP) con los fragmentos (pb) que en el presente estudio han facilitado la discriminación de muestras con o sin aceites añadidos

Grupo	Bacterias ruminales compatibles	^a Tamaño de fragmento <i>in silico</i> (pb)	^b Tamaño de fragmento real (pb)	^c Frecuencia	
				Control	Aceites
Bacteroidales	Bacteroidales	91-93	91	4 (7,9)	11 (2,9)
Bacteroidales	Bacteroidales	100	100	4 (5,0)	12 (11,7)
Bacteroidales	Prevotella	102	102	4 (22,7)	12 (28,1)
Clostridiales	Roseburia, Ruminococcus, Butyrivibrio, Pseudobutyrvibrio	189-190	189	4 (6,6)	11 (3,0)
Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiales	201	201	2 (0,6)	12 (2,0)
Proteobacteria	Ruminobacter	217	217	0	10 (8,1)

^a Tamaño de fragmento *in silico* obtenido con la herramienta tap-trFLP del RDP y Hha I;

^b Tamaño de fragmento en nuestras muestras tras la digestión del producto de la PCR con Hha I;

^c Número de muestras que contienen el pico. La altura relativa media (%) de cada pico en las muestras se encuentra entre paréntesis.

En resumen, la utilización de T-RFLP permite evidenciar los cambios que se producen en las comunidades bacterianas del rumen en fermentadores continuos (Rusitec) como consecuencia de la adición de aceites de origen vegetal al pienso. Además, la combinación de T-RFLP con el análisis de la altura relativa de los picos obtenidos mediante PCA permite identificar aquellos fragmentos (pb) que realmente posibilitan esa discriminación y los grupos bacterianos compatibles con ellos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Castillo, M., Martín-Orúe, S.M., Nofrías, M., Manzanilla, E.G., Gasa, J., 2007. *Vet. Microbiol.*, 124, 239–247.
- Carro, M.D., López, S., Valdés, C., Ovejero, F.J., 1999. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 79, 279-288.
- Paillard, D., McKain, N., Chaudhary, L., Walker, N., Pizette, F., Koppova, I., McEwan, N., Kopečný, J., Vercoe, P., Louis, P., Wallace, R.J., 2007. *Antonie Leeuwenhoek*, 91, 417-422.
- Ribosomal Data Project [on line: <http://rdp8.cme.msu.edu/html/TAP-trflp.html>]

Agradecimientos: Investigación financiada por la CICYT AGL2005-04760-C02-02 y la Junta de Castilla y León (GR158 y LE007A07)

EFFECTS OF THE ADDITION OF VEGETABLE OILS TO FEED ON RUMEN BACTERIA COMMUNITIES IN CONTINUOUS CULTURES (RUSITEC)

ABSTRACT: The objective of this work was to investigate the effects of the addition of vegetable oils to the feed on ruminal bacteria communities in continuous cultures of mixed ruminal microorganisms. Rusitec vessels were fed a total mixed ration, without oil supplement (control) or with the addition of one vegetable oil (olive, sunflower or linseed oils). Fermentation was maintained in the cultures for three weeks, samples of digesta were collected and bacterial DNA was extracted for studies of microbial diversity using the T-RFLP method. Experimental treatments were significantly clustered from the T-RFLP profiles, so that unsupplemented cultures were clearly differentiated. Using fragment size libraries for a most probable identification of peaks recorded differences between control and supplemented cultures could be established. It was concluded that oil supplementation had a significant and selective effect on ruminal bacteria communities.

Key words: rumen bacteria, rumen fermentation, vegetable oil, T-RFLP, Rusitec

ANEXO 4

In vitro forage digestibility under suboptimal microbial inoculum and culture media pH conditions

Vargas J.E., López S., Giráldez F.J., González J.S.

in

Papachristou T.G. (ed.), Parissi Z.M. (ed.), Ben Salem H. (ed.), Morand-Fehr P. (ed.).
Nutritional and foraging ecology of sheep and goats

Zaragoza : CIHEAM / FAO / NAGREF

Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 85

2009

pages 291-296

Article available on line / Article disponible en ligne à l'adresse :

<http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=801020>

To cite this article / Pour citer cet article

Vargas J.E., López S., Giráldez F.J., González J.S. **In vitro forage digestibility under suboptimal microbial inoculum and culture media pH conditions**. In : Papachristou T.G. (ed.), Parissi Z.M. (ed.), Ben Salem H. (ed.), Morand-Fehr P. (ed.). *Nutritional and foraging ecology of sheep and goats*. Zaragoza : CIHEAM / FAO / NAGREF, 2009. p. 291-296 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 85)

<http://www.ciheam.org/>
<http://om.ciheam.org/>

***In vitro* forage digestibility under suboptimal microbial inoculum and culture media pH conditions**

J.E. Vargas*, S. López*, F.J. Giráldez*** and J.S. González***

*Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León,
Campus de Vegazana s/n, 24071 León (Spain)

**Departamento de Sistemas de Producción, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas,
Calle 65 no. 26-10, Apdo. Aéreo 275, Manizales (Colombia)

***Estación Agrícola Experimental (CSIC), Finca Marzanas, 24346 Grulleros, León (Spain)

Abstract. In order to study the effects of the diet fed to animals from which rumen liquor was obtained (inoculum) and culture media pH conditions on *in vitro* forage dry matter digestibility (IVD), a factorial design experiment was carried out (3 diets and 3 pH conditions). Diets varied in forage to concentrate ratio: 100% forage (F100), 50% forage (F50) and 20% forage (F20). Rumen liquor from animals eating these diets was used to inoculate batch cultures to determine IVD (ANKOM procedure). pH was decreased by means of either: (i) adding barley or grass hay into culture media (10 g/l of media); or (ii) replacing control buffer (bicarbonate) with any of two McIlvaine (MI) solutions, 1000 ml containing 180 (MI180) or 530 (MI530) ml of citric acid. Four forages of different cell wall characteristics were used in digestibility assays. Diet affected pH of the ruminal inoculum (6.8, 6.3 and 4.9 for F100, F50 and F20, respectively). Bicarbonate solution buffered initial pH of culture media (7.0, 6.9 and 6.7 for F100, F50 and F20, respectively). Digestibility was significantly affected ($P < 0.001$) by the diet fed to donor animals, decreasing as concentrate increased. MI180 and MI530 treatments led to a lower initial pH (6.5 and 5.5 for MI180 and MI530, respectively). The addition of barley or hay lowered final pH (6.8, 6.1 and 6.5 for control, barley and hay treatments, respectively). Barley decreased digestibility of straw and beet pulp, especially with F20. With MI buffers there was a linear decrease in digestibility of grass hay, straw and beet pulp. This decline was greater with buffer MI530 (lower pH) and high proportions of concentrate in the diet. In conclusion rumen pH and the type of diet fed to donor animals have an important effect on forage digestibility, probably due to changes in the ruminal microbial population.

Keywords. Rumen pH – Forage digestibility – Ruminal inoculum.

Digestibilité in vitro des fourrages dans des conditions suboptimales d'inoculum microbien et de milieux de culture : Conditions du pH

Résumé. Afin d'étudier les effets du régime alimentaire pour les animaux donneurs de jus de rumen et du pH du milieu de culture sur la digestibilité *in vitro* de la matière sèche des fourrages, on a conduit une expérience selon un plan factoriel (3 régimes et 3 conditions de pH). Les rations avaient différentes proportions fourrage:concentré : uniquement le fourrage (F100), fourrage 50% (F50) et fourrage 20% (F20). Les jus de rumen des animaux recevant les trois rations ont été utilisés pour inoculer les systèmes de fermentation pour déterminer la digestibilité *in vitro* (procédé d'ANKOM). On a réduit les niveaux de pH au moyen de : (i) l'addition d'orge ou de foin d'herbe dans les milieux de culture (10 g/l de milieu) ; ou (ii) en remplaçant le tampon de contrôle (bicarbonate) par deux solutions de McIlvaine (MI), contenant 180 (MI180) ou 530 (MI530) ml d'acide citrique dans 1 litre de tampon. Quatre fourrages avec des parois cellulaires de différentes caractéristiques ont été utilisés dans des essais de digestibilité. Le régime haut ou bas en aliment concentré a affecté significativement le pH de l'inoculum (6,8, 6,3 et 4,9 pour F100, F50 et F20, respectivement). Le tampon du témoin a amorti le pH initial des milieux de culture (7,0, 6,9 et 6,7 pour F100, F50 et F20, respectivement). La digestibilité a été sensiblement affectée ($P < 0,001$) par la ration, étant diminuée à mesure que la proportion de concentré augmentait. Les traitements MI180 et MI530 ont mené à un pH initial inférieur (6,5 et 5,5 pour MI180 et MI530, respectivement). L'addition de l'orge ou du foin a diminué le pH final (6,8, 6,1 et 6,5 pour des traitements contrôle, orge et foin, respectivement). L'orge a diminué la digestibilité de la paille et des pulpes de betterave, particulièrement avec F20. Avec le tampon MI il y a eu une diminution linéaire de la digestibilité du foin d'herbe, de la paille et des pulpes de betterave, mais elle a été plus forte avec MI530 (pH inférieur) et les proportions élevées de concentré dans la ration. En conclusion, le pH du rumen et la ration distribuée aux

I – Introduction

Since the energy supply from roughages to high milk producing ruminants is limited even with roughages of high digestibility (Kaufmann, 1976), feeding systems based on high concentrate diets have become common for ruminants in intensive systems. As a result, starchy diets rich in cereals are considered a factor responsible for rumen acidosis, a common problem in dairy herds (Krause and Oetzel, 2006). Acidosis is also a problem in feedlot steers or lambs due to the market conditions where the cost per megacalorie of dietary ingredients favours feeding high concentrate diets (Brown *et al.*, 2006). Additionally, the move towards high concentrate diets is stimulated because rich concentrate diets are easier to manipulate.

Ruminal pH drops when ruminants consume high amounts of rapidly fermentable (non-fibre) carbohydrates, the main constituents of high grain diets. *In vivo*, low ruminal pH can produce a decrease in fibre digestion (Miller and Muntifering, 1985). In contrast, when *in vitro* fermentation systems are used to determine digestibility, pH in the incubation medium is usually adjusted to near 7.0. Thus, in order to mimic *in vivo* pH conditions some buffer systems, allowing low pH, have been evaluated (Elving *et al.*, 1956; Grant and Mertens, 1992a). In addition, it is well known that the type of diet fed to donor animals from which rumen fluid that is used as inoculum for *in vitro* studies is obtained may affect the microbial population, and thus the fermentation pattern in *in vitro* cultures (Ottou and Doreau, 1996). Our experiment was designed to investigate the effects of the type of diet fed to animals that are used as donors of rumen liquor and culture media pH conditions on forage dry matter digestibility *in vitro*.

II – Materials and methods

Three mature rumen cannulated Brown Swiss steers were individually housed and fed a diet consisting of grass hay and concentrate. Three diets were formulated by changing the forage to concentrate ratio: 100% forage (F100), 50% forage (F50) and 20% forage (F20) on a dry matter (DM) basis. Each diet was fed at maintenance to the three animals during a 14-d feeding period. On the last day of each period ruminal fluid was taken to inoculate bottles for the *in vitro* digestibility ANKOM procedure (Mabjeesh *et al.*, 2000), and then diet fed to the animals was changed. Water was freely available at all times.

Rumen digesta was collected 4 hours after morning feeding from the reticulum near the reticulomasal orifice. The digesta from each animal was filtered through several layers of gauze cloth, mixed on a volume basis for each animal and kept in pre-warmed thermos until use (within approximately 30 min).

Apart from the control treatment (C, bicarbonate buffer, no fermentable substrate added to the incubation medium), culture medium pH conditions were decreased by different means. In Experiment 1, pH in the incubation medium was changed by adding either finely ground barley (B) or grass hay (H) directly (10 g/l of medium) into the fermentation vessel. In Experiment 2, bicarbonate buffer [with 4 g of $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ and 35 g of NaHCO_3 /l of distilled water] was used in the control cultures, whereas in the treatment cultures the bicarbonate buffer was replaced with the same volume of any of two McIlvaine (MI) solutions (mixture 0.1 M citric acid and 0.2 M Na_2HPO_4 , resulting in lower pH as more citric acid is included in the mixture), containing either 180 ml of citric acid solution and 820 ml of Na_2HPO_4 solution (buffer MI180) or 530 ml of citric acid solution and 470 ml of Na_2HPO_4 solution (buffer MI530). Culture medium contained buffer solution (as described above), macro- and micro-minerals solutions, resazurin and reducing agent (Menke and Steingass,

1988). Just before incubation, culture medium (800 ml/l) and rumen inoculum (200 ml/l) were mixed under anaerobic conditions.

Four forages with different cell wall characteristics were incubated: lucerne hay, grass hay, straw and previously washed sugar beet pulp NDF. For incubation, forages were ground to pass through a 1 mm screen and dried at 60°C for 48 h. Then, 500 mg of each sample were weighed into porous synthetic fibre bags (F57; 5 × 5.5 cm², ANKOM Technology Corporation), which were then heat-sealed and incubated in a 4 l digestion vessel (20 bags per vessel) for 24 h at 39°C. After that, bags were oven dried and weighed to determine DM disappearance. One incubation vessel was used for each experimental treatment, and then in each vessel five bags were incubated with each of the forages studied. Dry matter digestibility data were analyzed by ANOVA following a factorial design with three diets fed to donor animals (F100, F50 and F20) and three treatments used to affect incubation pH: (i) treatments C, B and H in Experiment 1; or (ii) treatments C, M180 and M1530 in Experiment 2. In addition, the pH of each vessel was measured at inoculation (initial) and after 24 h (final) of incubation.

III – Results and discussion

The type of diet fed to donor animals had a marked effect on the inoculum pH, which was noticeably lower with diet F20 (4.9) than with the other two diets (Table 1). This lower pH with a concentrate diet was in agreement with Krause and Oetzel (2006) who pointed out that ruminal pH is driven by the amount of fermentable carbohydrate in each meal. The addition of the bicarbonate solution buffered pH in the culture medium resulting in initial values close to 7.

Table 1. pH of culture medium upon the addition of a fermentable substrate (barley or grass hay)

Treatments	Incubation time	Diet of donor animals		
		F100	F50	F20
Rumen fluid	Before	6.8	6.3	4.9
Control	Initial	7.0	6.9	6.7
	Final	6.8	6.8	6.7
Barley	Initial	7.0	7.0	6.7
	Final	6.4	6.2	5.8
Grass hay	Initial	7.1	7.0	6.8
	Final	6.5	6.5	6.5

Addition of both barley and hay to the incubation medium had an effect on final pH, which was more noticeable with barley (Table 1) because of its higher content of rapidly fermentable carbohydrates. These results are in line with those presented by Mould *et al.* (2005) who found a decline in culture medium pH from 6.7 to 6.0 after 24 h of incubation as a result of adding 1.0 g ground wheat in 100 ml of Theodorou's culture medium.

In contrast, when the diet was switched from F100 to F20, M180 and M530 buffers caused a drop in initial pH of 0.6 and 0.8, respectively (Table 2). Grant and Mertens (1992b) observed that addition of bicarbonate was essential to keep proper fermentation conditions, and to prevent a sharp and irreversible drop in pH. Despite the donor animal diet, M1530 maintained a relatively stable pH after 24 hours of incubation, while some pH decline was observed with M180 (between 0.4 and 0.6 units). It has to be pointed out that in our fermentation systems 1000 ml of culture medium contained only 190 ml of buffer (bicarbonate in the control, or M180 or M1530 buffers), whereas Grant and Mertens (1992b) used 800 ml of buffer per 1000 ml culture medium, and also incubated a greater relative amount of substrate dry matter (12.5 g/l vs 5.0 g/l).

Table 2. pH of culture medium with different buffer solutions

Treatments	Incubation time	Diet of donor animals		
		F100	F50	F20
Control	Initial	7.0	6.9	6.7
	Final	6.8	6.8	6.7
MI180	Initial	6.7	6.6	6.1
	Final	6.2	6.0	5.7
MI530	Initial	5.8	5.5	5.0
	Final	5.7	5.3	5.3

For the control buffer, forage digestibility was significantly affected ($P < 0.001$) by the diet fed to donor animals. Forage digestibility decreased as the proportion of concentrate in the diet increased (Tables 3 and 4). The decrease in digestibility was greater for straw, grass hay and beep pulp than for lucerne hay. Tejido *et al.* (2002) also found that the use of rumen liquor from animals fed a diet with 80% concentrate resulted in lower ($P < 0.05$) *in vitro* DM digestibility for six forages (oat straw and five hays) compared to rumen liquor from animals fed a diet with only 20% concentrate.

Table 3. Effect of barley grain and grass hay on *in vitro* dry matter digestibility

	Diet of donor animals			Means	P<($\pm$ SE)
	F100	F50	F20		
Lucerne hay					
Control	0.48	0.48	0.45	0.47	
Barley	0.50	0.47	0.46	0.48	
Grass hay	0.49	0.49	0.48	0.49	
Means	0.49	0.48	0.46		0.028($\pm$ 0.010)
P<($\pm$ SE)				0.290($\pm$ 0.010)	
Grass hay					
Control	0.40	0.40	0.29	0.36 ^a	
Barley	0.36	0.32	0.27	0.32 ^b	
Grass hay	0.39	0.38	0.29	0.35 ^{ab}	
Means	0.38 ^a	0.37 ^a	0.28 ^b		0.000($\pm$ 0.011)
P<($\pm$ SE)				0.001 $\pm$ (0.011)	
Straw					
Control	0.32	0.30	0.19	0.27 ^a	
Barley	0.31	0.25	0.14	0.23 ^b	
Grass hay	0.33	0.26	0.19	0.25 ^{ab}	
Means	0.32 ^a	0.27 ^b	0.17 ^c		0.000($\pm$ 0.013)
P<($\pm$ SE)				0.018(0.013)	
Beet pulp					
Control	0.67	0.63	0.53	0.61 ^a	
Barley	0.50	0.54	0.41	0.48 ^b	
Grass hay	0.61	0.64	0.55	0.60 ^a	
Means	0.59 ^a	0.60 ^a	0.50 ^b		0.000($\pm$ 0.017)
P<($\pm$ SE)				0.000($\pm$ 0.017)	

Table 4. Effect of MI buffer on *in vitro* dry matter digestibility

	Diet of donor animals			Means	P<($\pm$ SE)
	F100	F50	F20		
Lucerne hay					
Control	0.48	0.48	0.45	0.47 ^a	
MI180	0.41	0.43	0.45	0.43 ^b	
MI530	0.43	0.39	0.40	0.41 ^b	
Means	0.44	0.43	0.43		0.556($\pm$ 0.008)
P<($\pm$ SE)				0.000($\pm$ 0.008)	
Grass hay					
Control	0.40	0.40	0.29	0.36 ^a	
MI180	0.33	0.30	0.29	0.30 ^b	
MI530	0.28	0.23	0.25	0.25 ^c	
Means	0.34 ^a	0.31 ^b	0.28 ^c		0.000($\pm$ 0.009)
P<($\pm$ SE)				0.000($\pm$ 0.009)	
Straw					
Control	0.32	0.30	0.19	0.27 ^a	
MI180	0.24	0.19	0.15	0.19 ^b	
MI530	0.15	0.13	0.12	0.14 ^c	
Means	0.24 ^a	0.21 ^b	0.16 ^c		0.000($\pm$ 0.009)
P<($\pm$ SE)				0.000($\pm$ 0.009)	
Beet pulp					
Control	0.67	0.63	0.53	0.61 ^a	
MI180	0.44	0.49	0.39	0.44 ^b	
MI530	0.32	0.28	0.25	0.28 ^c	
Means	0.47 ^a	0.47 ^a	0.39 ^b		0.000($\pm$ 0.015)
P<($\pm$ SE)				0.000($\pm$ 0.015)	

The addition of barley caused a decrease in digestibility of straw and beet pulp, and this effect was more noticeable with the high concentrate inoculum (Table 3). This treatment may affect the activity of ruminal fibrolytic bacteria that digest plant cell walls. Cellulolytic activity in the rumen is influenced by predominant bacterial species, forage incubated and the environmental conditions under which ruminal digestion occurs (Grant and Weidner, 1992).

Lower culture medium pH induced by the addition of MI led to a linear decrease in digestibility of grass hay, straw and beet pulp (Table 4), indicating that cellulolytic activity was depressed as rumen pH declined. This effect was greater with MI530 (lower pH) than with MI180, and was also more noticeable as the proportion of concentrate in the diet of donor animals was higher, probably due to the type of microbial population that has been established on the rumen of animal fed a starchy diet. Mourino *et al.* (2001) found comparable results; the rate of cellulose digestion was decreased as pH was decreased from 6.86 to 6.02. In addition, Russell and Wilson (1996) reported that even a moderate decline in pH can have a negative impact on *in vitro* ruminal cellulose digestion, and observed that hay fermentation was drastically inhibited when the final pH was below 5.70.

IV – Conclusions

In conclusion, both the rumen pH of the culture media and the type of diet fed to animals used as donors of rumen fluid have an important effect on forage digestibility, probably due to changes in

the ruminal microbial population. Digestibility was substantially reduced in the case of more fibrous forages, and using inoculum from donor animals fed higher proportions of concentrate in the diet.

References

- Brown M.S., Ponce C.H. and Pulikanti R., 2006.** Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: Performance and ruminal metabolism. In: *J. Anim. Sci.*, 84. p. E25-E33.
- Elving P.J., Markowitz J.M. and Rosenthal I., 1956.** Preparation of buffer systems of constant ionic strength. In: *Anal. Chem.*, 28. p. 1179-1180.
- Grant R.J. and Mertens D.R., 1992a.** Development of buffer systems for pH control and evaluation of pH effects on fiber digestion *in vitro*. In: *J. Dairy Sci.*, 75. p. 1581-1587.
- Grant R.J. and Mertens D.R., 1992b.** Influence of buffer pH and raw corn starch addition on *in vitro* fiber digestion kinetics. In: *J. Dairy Sci.*, 75. p. 2762-2768.
- Grant R.J. and Weidner S.J., 1992.** Digestion kinetics of fiber: Influence of *in vitro* buffer pH varied within observed physiological range. In: *J. Dairy Sci.*, 75. p. 1060-1068.
- Kaufmann W., 1976.** Influence of the composition of the ration and the feeding frequency on pH-regulation in the rumen and on feed intake in ruminants. In: *Livest. Prod. Sci.*, 3. p. 103-114.
- Krause K.M. and Oetzel G.R., 2006.** Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. In: *Anim. Feed Sci. Technol.*, 126. p. 215-236.
- Mabjeesh S.J., Cohen M. and Arieli A., 2000.** *In vitro* methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: Comparison of methods and inoculum source. In: *J. Dairy Sci.*, 83. p. 2289-2294.
- Menke K.H. and Steingass H., 1988.** Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. In: *Anim. Res. Dev.*, 28. p. 7-55.
- Miller B.G. and Muntifering R.B., 1985.** Effect of forage:concentrate on kinetics of forage fiber digestion *in vivo*. In: *J. Dairy Sci.*, 68. p. 40-44.
- Mould F.L., Morgan R., Kliem K.E. and Krystallidou E., 2005.** A review and simplification of the *in vitro* incubation medium. In: *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123-124. p. 155-172.
- Mourino F., Akkarawongsa R. and Weimer P.J., 2001.** Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. In: *J. Dairy Sci.*, 84. p. 848-859.
- Ottou J.F. and Doreau M., 1996.** Influence of niacin on *in vitro* ruminal fermentation and microbial synthesis depending on dietary factors. In: *Anim. Feed Sci. Technol.*, 58. p. 187-199.
- Russell J.B. and Wilson D.B., 1996.** Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? In: *J. Dairy Sci.*, 79. p. 1503-1509.
- Tejido M.L., Ranilla M.J. and Carro M.D., 2002.** *In vitro* digestibility of forages as influenced by source of inoculum (sheep rumen versus Rusitec fermenters) and diet of the donor sheep. In: *Anim. Feed Sci. Technol.*, 97. p. 41-51.

ANEXO 5

**Rowett Institute
of Nutrition and Health**
University of Aberdeen

Rowett-INRA 2010

23-25 June 2010

Aberdeen Exhibition and Conference Centre

Gut Microbiology: new insights into gut microbial ecosystems

7th Joint Symposium organised by the **Rowett Institute of Nutrition and Health**, University of Aberdeen, Scotland (UK) & the **Institut National de la Recherche Agronomique**, Clermont-Ferrand-Theix (France)

P3/69/0205

Fish and algal oils induce changes in rumen bacterial communities in Rusitec fermenters

Sonia Andrés¹, Julio Ernesto Vargas^{1,2}, Lorena López-Ferreras^{1,3}, David Yañez-Ruiz⁴, Secundino López¹

¹Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Universidad de León, León, Spain, ²Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia, ³Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC/UAM, Madrid, Spain, ⁴Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, Spain

An experiment was conducted in rumen simulating fermenters (Rusitec) to investigate changes in bacterial communities in response to diet supplementation with marine oils (fish and algae). Continuous cultures of ruminal microorganisms in 16 Rusitec vessels were fed a total mixed ration (TMR) for lactating sheep (20% alfalfa hay 80% concentrate). Four experimental treatments (4 vessels/treatment) were: control TMR (C), TMR supplemented with 2% sunflower oil (SO), SO diet supplemented with 1% fish oil (FO) and SO diet supplemented with 1% algal oil (AO). After 19 d, samples of digesta were collected, frozen and freeze-dried for DNA extraction. A fragment of the 16S rRNA gene was amplified by PCR using bacterial universal primers. Fluorescent-labeled PCR products were purified and subjected to restriction hydrolysis with enzyme HaeIII during 12 h at 37°C. Terminal restriction fragments (TRF) were analyzed by capillary electrophoresis. Differences in ruminal bacterial communities among different treatments were observed when cluster and principal components analyses were performed on matrix data of relative peak height profiles for each sample. Different clusters were detected for C or SO vessels compared with FO or AO vessels. TRFs with greater loading weights were identified and considered as mainly responsible for clustering and discriminations of treatments. The tap-trFLP tool of the Ribosomal Data Project was used to find possible ruminal species compatible with these TRFs. Using this approach, it seemed that relative contribution of some bacterial species (*Clostridiales*, *Prevotella*, *Megasphaera*) was increased in response to marine oils, whereas other species (*Butyrivibrio*) would be negatively affected.

P3/70/0206

Effect of dietary protein on faecal short chain fatty acids

Anthony Richardson, Sara Hazim, Alexandra Johnstone, Silvia Gratz

Rowett Institute of Nutrition and Health, University of Aberdeen, Aberdeen, United Kingdom

Increased dietary protein has been shown to induce satiety in subjects on weight loss diets. High protein diets increase protein intake at the expense of carbohydrate and alter the substrates available to the colonic bacteria. Short chain fatty acids (SCFA) acetate, propionate and butyrate are major fermentation products and are important for gut health, providing protection against colorectal cancer. Production of branched chain fatty acids is a good indicator of colonic protein fermentation whereas potentially toxic by-products such as ammonia, N-nitrosocompounds, phenols and cresols also occur. The aim of this study was to determine changes in faecal SCFA of subjects on diets with varying protein content.

Obese volunteers (n=18) received a controlled body weight maintenance diet for 7 days and were then randomised into 2 intervention groups receiving either a normal protein weight loss diet or a high protein weight loss diet for 10 days in a cross over design. Faeces were ultra-centrifuged to obtain faecal water and SCFA were analysed by capillary gas chromatography. The high protein diet significantly reduced faecal concentrations of total SCFA (145.22mM - 115.48 mM), acetate (77.03 mM - 61.06 mM) and butyrate (28.55 mM - 19.33 mM) compared to maintenance diet. A comparison of molar ratios of butyrate showed that higher protein intake decreased the molar ratio of butyrate independent of the effect of reduced energy intake.

The high protein weight loss diet may exert a negative effect on the colon health by reducing the total SCFA and in particular butyrate.

ANEXO 6

ISSN 2040-4700

SEPTEMBER 2011

VOLUME 2 PART 2

Advances in Animal Biosciences

Proceedings of the 8th International
Symposium on the Nutrition of Herbivores
(ISNH8)

CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

Proceedings
of the 8th International Symposium on the
Nutrition of Herbivores

2011

Advances in Animal Biosciences

This book is part of a series which is a companion to the journal ANIMAL

The Stapledon Memorial Trust

Eighth International Symposium on the Nutrition of Herbivores
(ISNH8)

6th-9th September 2011, Aberystwyth, Wales, UK, www.isnh8.org

These Proceedings of the International Symposium on the Nutrition of Herbivores constitute summaries of papers presented at the 8th conference in Aberystwyth, Wales UK, 6th–9th September 2011.

The summaries have not been edited and the Organising Committee and publisher accept no responsibility for their accuracy. Views expressed in all contributions are those of the authors and not those of the symposium's committee members.

This publication contains all summaries that were available at the time of going to press.

ISNH8 COMMITTEE MEMBERS

Local Organising Committee

Nigel Scollan, Chair
Jamie Newbold
John Healey
Christina Marley
Michael Lee
Michael Rose
Neil McEwan
Jon Moorby
Siwan Griffiths
Roger Merry
Alison Kingston-Smith
Helen Lloyd
Jessica Longworth

International Advisory Committee

Hugh Dove, Chairperson, Australia
Andrew Sykes, New Zealand
René Baumont, France
Isabelle Cassar-Malek, France
Octavio Castelan-Ortega, Mexico
Jan Dijkstra, The Netherlands
Simone Hoskins, New Zealand
Denis Krause, Canada
Rod Mackie, USA
Ilias Kyriazakis, United Kingdom
Ruijun Long, China
Chris McSweeney, Australia
Qingxiang Meng, China
Bob Ørskov, United Kingdom
Dennis Poppi, Australia
Nigel Scollan, United Kingdom
Abeliza Kimambo, Tanzania
Peiqiang Yu, Canada

This publication has been produced with the kind support of the Stapledon Memorial Trust

© 2011 Animal Consortium
ISSN 2040-4700

Effects of forage to concentrate ratio in the diet and pH on ruminal fermentation in Rusitec fermenters

J E Vargas^{1,2}, S Andrés¹, D R Yañez-Ruiz³, L López-Ferreras⁴, S López¹

¹Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), León, Spain, ²Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia, ³Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, Spain, ⁴Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Madrid, Spain

Email: s.lopez@unileon.es

Introduction Diet and rumen pH are the main factors affecting rumen fermentation (Calsamiglia *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010). The Rusitec system simulates rumen fermentation under controlled conditions allowing for examining separately the effects of both factors. The objective of this work was to study the effects of forage to concentrate ratio in the diet and of pH on ruminal fermentation patterns, methane production and digesta fatty acid composition in Rusitec fermenters.

Materials and methods Four treatments were randomly allocated to 16 Rusitec vessels in a completely random design with a 2 x 2 factorial arrangement. High forage (HF, 127 g of CP and 502 g of NDF/kg of DM) diet contained 800 g/kg of hay, whereas high concentrate (HC, 186 g of CP and 284 g of NDF/kg of DM). Both diets were supplemented with 30 g of sunflower oil/kg of diet. To vary ruminal pH and culture medium buffering capacity, composition of the artificial saliva infused into the vessels was modified changing the concentration of bicarbonate, so that rumen pH was 6.82 with the high bicarbonate buffer and 6.44 with the low bicarbonate buffer. The experiment consisted of a 7-day adaptation period followed by a 14-day sample collection period. On collection days (1, 2, 3, 8, 9 and 10 of the collection period) total gas and liquid effluent outputs were recorded and sampled in order to determine CH₄ and VFA, L-lactate and NH₃-N. Organic matter and NDF disappearance from the bags was measured after 48 h of incubation in the vessels. On day 6 of the collection period, microbial protein synthesis was estimated using ¹⁵N as microbial marker, measuring its concentration in samples of digesta and microbial pellets after an infusion of the marker into the vessels.

Results The interaction diet x rumen pH was not significant for any of the studied parameters. There was no difference (P>0.05) between diets in rumen pH. Substrate disappearance from the bags was greater for the more digestible HC diet than for the HF diet (0.661 vs. 0.491, SEM 0.035), and was not affected by rumen pH, although tended (P=0.088) to be greater at a higher pH (0.592 vs. 0.560). Total gas production was greater for HC than for HF diet (2.41 vs. 1.89 l/day, P<0.001), and for high than for low rumen pH (2.31 vs. 1.99 l/day; P=0.019). Methane daily output, expressed per g of fermented OM was not affected by diet (0.720 vs. 0.743 mmol/g of fermented OM for HC and HF, respectively, P=0.833) or rumen pH (0.790 vs. 0.674 mmol/g of fermented OM for high and low pH, respectively, P=0.303). Total VFA production was higher for HC than for HF diet (43.4 vs. 38.2 mmol/d, P=0.006). There were no significant differences between diets in the production of acetic or propionic acids (P>0.05), whereas iso-butyric, butyric, valeric, isovaleric and caproic outputs and acetic to propionic ratio (2.35 vs. 2.02, P<0.001) were greater for the HC diet. L-lactate was higher for HC diet (12.7 vs. 7.02 mg/day, P<0.001). Total VFA production and acetic to propionic ratio tended to be higher at higher pH (42.5 vs. 39.1 mmol/day, P=0.052 and 2.25 vs. 2.12, P=0.083). Ammonia output was greater with HC diet (133.5 vs. 80.6 mg/day, P<0.001) and at higher pH (114.0 vs. 100.1 mg/day, P=0.004). The efficiency of microbial protein synthesis was not affected by diet or buffer composition (P>0.05); however daily microbial protein synthesis was higher with HC diet (0.568 vs. 0.464 g/day, P=0.015). Rumen pH had little effects on fatty acid composition of digesta (Table 1) with high pH giving rise to greater stearic and vaccenic acids proportions. Diet affected fatty acid composition of digesta to a greater extent (Table 1) so that stearic and CLA percentages were lower and oleic and linoleic percentages were greater with HC compared with HF diet.

Table 1 Profile of medium and long chain fatty acids in rumen digesta (% of total fatty acids measured)

	Rumen pH			Diet			SEM
	6.82	6.44	P =	High Concentrate	High Forage	P =	
Palmitic acid	23.5	19.8	0.080	21.4	21.9	0.801	14.83
Stearic acid	12.3	9.9	0.012	10.0	12.2	0.017	2.70
Vaccenic acid	2.34	1.53	0.030	1.89	2.00	0.745	0.379
Oleic acid	21.6	20.8	0.743	23.3	19.5	0.050	10.66
Linoleic acid	10.2	13.6	0.114	14.3	9.5	0.033	15.94
Linolenic acid	1.68	2.06	0.359	1.59	2.15	0.179	0.632
Conjugated linoleic acid (CLA)	0.204	0.218	0.690	0.167	0.241	0.032	0.0023

Conclusions Diet (forage to concentrate ratio) and, to a lesser extent, rumen pH had significant effects on rumen fermentation, in particular on substrate degradation, VFA output and fatty acid profile in the digesta. Methane output was not affected by diet or rumen pH. Fatty acid would be hydrogenated to a greater extent with a high forage diet. Although Rusitec system mimics rumen fermentation, simulation of *in vivo* fermentation may be affected by the type of diet (Martínez *et al.*, 2010).

References

- Calsamiglia, S., Cardozo, P.W., Ferret, A. *et al.* 2008. Journal of Animal Science. 86, 702–711.
 Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Tejido, M.L. *et al.* 2010. Journal of Dairy Science. 97, 3684–3698.

ANEXO 7

The effect of olive, sunflower or linseed oils on the fermentation pattern and methane production in the rumen simulating technique

Vargas J.E., Andrés S., Yáñez Ruiz D.R., López S.

in

Ranilla M.J. (ed.), Carro M.D. (ed.), Ben Salem H. (ed.), Morand-Fehr P. (ed.).
Challenging strategies to promote the sheep and goat sector in the current global context

Zaragoza : CIHEAM / CSIC / Universidad de León / FAO

Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 99

2011

pages 163-168

Article available on line / Article disponible en ligne à l'adresse :

<http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=801551>

To cite this article / Pour citer cet article

Vargas J.E., Andrés S., Yáñez Ruiz D.R., López S. **The effect of olive, sunflower or linseed oils on the fermentation pattern and methane production in the rumen simulating technique.** In : Ranilla M.J. (ed.), Carro M.D. (ed.), Ben Salem H. (ed.), Morand-Fehr P. (ed.). *Challenging strategies to promote the sheep and goat sector in the current global context.* Zaragoza : CIHEAM / CSIC / Universidad de León / FAO, 2011. p. 163-168 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 99)

<http://www.ciheam.org/>
<http://om.ciheam.org/>

The effect of olive, sunflower or linseed oils on the fermentation pattern and methane production in the rumen simulating technique

J.E. Vargas^{*,**}, S. Andrés^{*}, D.R. Yáñez Ruiz^{***} and S. López^{*1}

^{*}Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), Finca Manzanas, 24346 León (Spain)

^{**}Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, calle 65, nº 26, Manizales Caldas (Colombia)

^{***}Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008 Granada (Spain)

¹s.lopez@unileon.es

Abstract. The objective of this study was to investigate the effects of the addition of different vegetable oils to the diet on the fermentation pattern and methane production in Rusitec fermenters. For this purpose four treatments were randomly allocated to sixteen fermenters in a completely random design. Inoculum was obtained from four ruminally fistulated Merino sheep fed lucerne hay and concentrate. Treatments were defined by the diet supplied to the fermenters, so that the control treatment (C) diet was a total mixed ration for ewes on lactation. In the other experimental treatments the control diet was supplemented with olive oil (OO), sunflower oil (SO) or linseed oil (LO) to reach a final concentration of 50 g oil/kg diet. After 7 days of adaptation, samples of effluent, fermenters' fluid content and digesta of each fermenter were collected during 10 days. There were no significant differences ($P>0.05$) between treatments in pH values in the fermenters' fluid content. The LO diet showed ($P<0.05$) the highest dry matter, organic matter and NDF disappearance. The lowest values were observed with the SO diet ($P<0.05$). However, there were no differences for ADF disappearance ($P>0.05$). All three oils reduced methane production compared with control cultures ($P<0.05$), but there were no differences in the daily gas production. There were no differences in acetate production. The LO diet gave rise to the highest and the control diet the lowest propionate production ($P<0.05$), whereas butyrate production decreased as a result of any oil addition. The acetate to propionate ratio was also decreased by any oil addition. There were no significant effects ($P>0.05$) of oil supplementation on L-lactate concentration. Ammonia N concentration was higher ($P<0.05$) in the control treatment, but there were no significant differences between treatments in microbial protein output. In conclusion, these results indicate that fermentation pattern is affected by oil supplementation mainly by decreasing the acetate to propionate ratio, as well as methane production.

Keywords. Vegetable oils – Volatile fatty acids – Methane – Rusitec.

Effet de l'huile d'olive, de tournesol ou de graines de lin sur le patron de fermentation et la production de méthane dans le système de simulation ruminale RUSITEC

Résumé. L'objectif de ce travail a été d'étudier les effets de 3 huiles végétales sur le patron de fermentation et la production de méthane dans le système RUSITEC. Nous avons évalué 4 traitements, appliqués à 16 fermenteurs selon un dispositif complètement aléatoire. L'inoculum a été obtenu de 3 brebis Mérinos alimentées à base de foin de luzerne et de concentré. Le traitement témoin (C) correspond à une ration complète pour des brebis en lactation. Concernant les autres traitements, le régime témoin a été supplémenté avec 50 g/kg d'huile d'olive (AO), d'huile de tournesol (AG) ou d'huile de lin (AL). Après 7 jours d'adaptation, des échantillons d'effluents, de liquide des fermenteurs et de digesta ont été prélevés tout au long d'une période de 10 jours. Aucune différence significative ($P>0.05$) du pH du contenu liquide des fermenteurs n'a été constatée entre les différents traitements. Le régime AL a montré ($P<0.05$) une plus importante disparition de matière sèche, matière organique et FDN. Les plus faibles taux de disparition ont été obtenues avec le régime AG ($P<0.05$). Néanmoins, il n'y a pas eu des différences au niveau de la disparition de FDA ($P>0.05$). En comparaison avec le traitement témoin, les 3 huiles ont réduit la production de méthane ($P<0.05$), mais il n'y a pas eu des différences dans la production de gaz et de l'acide acétique. La plus importante et la plus faible production de propionate ont été obtenues, respectivement, avec les traitements témoin et AL ($P<0.05$). La production de butyrate et le rapport acétate : propionate ont chuté avec l'addition des trois huiles. On n'a pas trou-

vé des effets significatifs ($P>0.05$) de la complémentation avec des huiles sur la concentration de lactate. La concentration d'azote ammoniacal la plus élevée a été obtenue avec le régime témoin ($P<0.05$). Cependant, Les différents traitements ont abouti à la même synthèse des protéines microbiennes. En conclusion, ces résultats indiquent que la fermentation est affecté avec l'incorporation des huiles dans la ration en réduisant le rapport acétate : propionate et la production de méthane.

Mots-clés. Huiles végétales – Acides gras volatils – Méthane – RUSITEC.

I – Introduction

Additions of fat to feeds for ruminants have been a recurrent nutritional issue, aiming to increase milk fat content, to make the most of considerable quantities of inedible fats available to the feed industry and to match the energy requirements of high producing animals (Palmquist and Jenkins, 1980). More recently, driven by concerns on human health (Harris, 2008) and environmental sustainability, feeding lipids has received attention as a mechanism to increase conjugated linoleic acid in ruminant products (Chilliard *et al.*, 2000) and to reduce methane emission (Beauchemin *et al.*, 2007).

It is known that C:18 polyunsaturated fatty acids (sunflower oil and linseed oil) are among those fat sources with potential to both reduce methane production (Martin *et al.*, 2008) and increase conjugated linoleic acid or vaccenic acid in the rumen (AbuGhazaleh and Jacobson, 2007; Luna *et al.*, 2008). Potential adverse effects of fat addition, however, still deserve attention, depending on fat characteristics (chain length, saturation, esterification), basal diet composition (forage vs concentrate), and level of inclusion (Chalupa *et al.*, 1984; Doreau and Ferlay, 1994; Dewhurst *et al.*, 2006). Therefore, effects of specific oil sources on digestibility, rumen fermentation and microbial population need to be assessed. The Rumen Simulation Technique (Rusitec) is an experimental procedure that allows precise control of conditions and factors affecting fermentation and measurement of fermentation end-products formation during relatively long periods of time (Czerkawski and Breckenridge, 1977; Czerkawski and Breckenridge, 1979).

The objective of this study was to investigate the effects of the addition of different vegetable oils (olive, sunflower and linseed oils) to the diet on the fermentation pattern and methane production in Rusitec fermenters.

II – Materials and methods

1. Apparatus and experimental treatments

The study was carried out using sixteen fermentation vessels of the Rusitec system (Czerkawski and Breckenridge, 1977). Inoculum was obtained from four ruminally fistulated Merino sheep fed a diet consisting (per kg) of 700 g grass hay and 300 g concentrate. On the first day of the experiment, vessels were inoculated with 400 ml of strained rumen fluid diluted with 250 ml of artificial saliva and 80 g of squeezed rumen contents. Particulate rumen contents were placed inside a nylon bag (100 μ m pore size) and then into the feed container together with a bag of fermentation substrate (15 g DM). After 24 h of incubation, bags with rumen contents were replaced by others with feed. Afterwards, bags with 48 h incubation residues were replaced with new bags containing feed. A continuous infusion of McDougall artificial saliva (pH 8.4) at a rate of 556 ml/day (dilution rate of 3.6%/h) was maintained through each vessel.

Four experimental treatments were defined by the diet used as fermentation substrate. Control treatment diet (C) consisted of a total mixed ration for ewes on lactation. In the other three treat-

ments the diet used in the control was supplemented by the addition of olive oil (OO), sunflower oil (SO) or linseed oil (LO) to reach a concentration of 50 g/kg. Ingredients and chemical composition are given in Table 1. Experimental diets to be fermented in Rusitec were prepared every three days and stored at 4°C until use.

Table 1. Ingredients and chemical composition of the experimental diets

Treatment	C	OO	SO	LO
Ingredients (g/kg DM)				
Cracked corn grain	250	237.5	237.5	237.5
Barley grain	150	142.5	142.5	142.5
Soybean meal	200	190	190	190
Lucerne hay	200	190	190	190
Beet pulp	90	85.5	85.5	85.5
Molasses	60	57	57	57
Bicarbonate	15	14.3	14.3	14.3
Mineral vitamin premix	35	33.3	33.3	33.3
Olive oil	0	50	0	0
Sunflower oil	0	0	50	0
Linseed oil	0	0	0	50
Composition (g/kg DM)				
Organic matter	925	927	930	929
Crude protein	152	150	157	162
Neutral detergent fibre	236	240	237	233
Ether extract	21.7	73.4	72.3	70.7

The incubation trial consisted of a 7-day adaptation period followed by a 14-day collection period. On collection days 1, 2, 3, 8, 9 and 10, gas and liquid effluent were collected and measured. Samples of gas were taken to measure CH₄ concentration, and VFA, L-lactate and ammonia concentrations were determined in effluent. Bags withdrawn from the vessels after 48 h of incubation were used to determine DM disappearance, as a measure of diet digestibility. Chemical composition of dried incubation residues was determined to calculate digestibility of feed components.

On day 6 of the collection period, effluent and feed residues in bag were mixed (considered representative of whole digesta) with an electric blender for 1 min and processed to determine microbial protein synthesis by ¹⁵N method as described by Carro and Miller (1999) and Giraldo *et al.* (2007), using a labelled microbial pellet obtained from differential centrifugation of digesta.

2. Chemical analysis

Experimental diets and incubation residues were analyzed to determine DM, ash and N according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1999). NDF and ADF and lignin analyses were carried out according to Van Soest *et al.* (1991). Ether extract was determined by the filter bag technology, using an Ankom XT15 extraction system (Ankom®, Macedon, USA).

The volume of gas produced was measured with a drum-type gas meter (model TG1; Ritter Apparatebau GmbH, Germany) and CH₄ was analyzed with a gas chromatograph as described by García-González *et al.* (2008). VFA concentrations were determined by gas chromatography (López and Newbold, 2007). Ammonia concentration was measured by a colorimetric method (Weatherburn, 1967) and lactate by an enzymatic-colorimetric method (Taylor, 1996). Analyses of ¹⁵N enrichment were performed by isotope ratio mass spectrometry (Carro and Miller, 1999).

3. Statistical analysis

Data were subjected to ANOVA using the GLM procedure of SAS (2002) for a complete randomized design with four replicates. The statistical model was $y_{ij} = \mu + O_i + e_{ij}$, where y_{ij} is the observation; μ the overall mean; O_i the supplemented oil and e_{ij} is the residual error. The random effect was fermentation vessel within treatment. Multiple comparisons of means among oil sources were performed using Tukey's test.

III – Results and discussion

There were not differences ($P>0.05$) between treatments in medium pH (Table 2). LO supplementation gave rise to higher OM, CP and NDF disappearance than SO treatment ($P<0.05$), with intermediate values in C and OO treatments (Table 2). Fat disappearance was higher in all supplemented treatments compared to control vessels ($P<0.05$). Although feeding lipids can inhibit fibre digestion in the rumen (Jenkins, 1993), our results are in line with those obtained in a Rusitec system by Jalc *et al.* (2007), who did not found differences in DM or NDF degradation when the diet was supplemented with oleic, linoleic or linolenic acids.

Table 2. Effects of oil addition on gas (total and methane), volatile fatty acids and L-lactate production and acetate to propionate ratio in the RUSITEC system

	C	OO	SO	LO	RSE	$P \leq$
pH	6.73	6.72	6.66	6.67	0.023	0.126
<i>Disappearance of:</i>						
Organic matter (fat free)	0.674 ^{ab}	0.708 ^{ab}	0.661 ^b	0.721 ^a	0.0254	0.022
Neutral detergent fibre	0.329 ^{ab}	0.347 ^a	0.290 ^b	0.354 ^a	0.0261	0.044
Crude protein	0.495 ^{ab}	0.549 ^a	0.476 ^b	0.547 ^a	0.0366	0.036
Fat	0.518 ^c	0.705 ^b	0.738 ^b	0.809 ^a	0.0286	<0.001
<i>Gas production:</i>						
Total (l/day)	3.01	2.75	2.81	2.98	0.131	0.470
CH ₄ (mmol/g of OM fermented)	1.02 ^a	0.81 ^b	0.78 ^b	0.73 ^b	0.090	0.005
<i>VFA (mmol/day)</i>						
Acetate	24.9	23.8	22.0	24.1	0.91	0.206
Propionate	8.39 ^b	10.30 ^{ab}	9.87 ^{ab}	11.88 ^a	0.684	0.003
Butyrate	7.38 ^a	5.64 ^b	5.50 ^b	5.51 ^b	0.332	0.005
Total VFA	51.2	48.5	46.2	50.7	1.43	0.109
Acetate : propionate ratio	2.99 ^a	2.32 ^b	2.27 ^b	2.03 ^b	0.092	<0.001
L-lactate (mg/day)	5.56	6.67	7.27	6.48	0.708	0.431
<i>Nitrogen metabolism</i>						
Ammonia (mg/day)	89.1 ^a	72.4 ^b	65.0 ^b	65.0 ^b	3.17	0.001
Microbial protein (g/day)	1.06	1.02	0.90	1.14	0.091	0.353

As for volatile fatty acid production (Table 2), there were no differences in total VFA and acetate production ($P>0.05$). However, all supplemented treatments showed higher propionate and lower butyrate productions compared to the control. As a result, acetate to propionate ratio was noticeably decreased by oil addition in comparison with control. There were no differences on L-lactate concentration. Similar effects on VFA production and molar proportions have been observed by Getachew *et al.* (2001), Jalc *et al.* (2006, 2007) and Toral *et al.* (2009).

Effects of fat on ruminal fibre digestibility and fermentation parameters are known to vary depending on basal diet, esterification, saturation and level of fat. In the present work, fat was in form of triglycerides that are known to have lesser adverse effects on rumen fermentation (Chalupa *et al.*, 1984).

Compared to control all three oils reduced methane production ($P < 0.05$), although there were no differences on total gas production (Table 2), in agreement with Gómez-Cortés *et al.* (2008) and Hervás *et al.* (2008) who observed (using the *in vitro* gas production technique) a lack of differences between control treatment (a high-concentrate diet) and the same diet supplemented with 6% of either soybean or sunflower oil, respectively. In general terms, it is known that lipid supplementation of diets reduces methane emissions by inhibiting organic matter fermented in the rumen, activity of methanogenic archae or ruminal protozoa, and through the disposal of hydrogen during the fatty acid biohydrogenation process (Johnson and Johnson, 1995). In the present work the reduction on methane production was not due to lower organic matter fermentation (Czerkawski *et al.*, 1966; Zhang *et al.*, 2008), and it seems likely that methanogenic archae could be affected. The lack of differences among the different oils used as supplements is in agreement with Jalc *et al.* (2007) and Beauchemin *et al.* (2007).

Ammonia concentration was higher in the control treatment ($P < 0.05$) than in the treatments including oil. Beauchemin *et al.* (2007) observed that the only major effect of lipid feeding on ruminal fermentation was a reduction in ruminal ammonia, without differences among lipid sources. However there were not significant differences among treatments in microbial protein synthesis (Table 2). In line with our results, addition of oleic, linoleic or linolenic acid to a basal diet of high quality pasture in a continuous fermenter did not affect microbial synthesis (Kolver *et al.*, 2002).

IV – Conclusion

In conclusion, these results indicate that a 5% inclusion level of olive, sunflower or linseed oil to a diet for dairy ewes affects the fermentation pattern mainly by decreasing the acetate to propionate ratio and methane production.

Acknowledgments

Funding received from Spanish MICINN (Projects AGL2008-04805 and AGL2005-04760) and from Junta de Castilla y León (Project GR158) is gratefully acknowledged.

References

- AbuGhazaleh A.A. and Jacobson B.N., 2007. The effect of pH and polyunsaturated C18 fatty acid source on the production of vaccenic acid and conjugated linoleic acids in ruminal cultures incubated with docosahexaenoic acid. In: *Animal Feed Science and Technology*, 136, p. 11-22.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1999. *Official Methods of Analysis*. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- Beauchemin K.A., McGinn S.M. and Petit H.V., 2007. Methane abatement strategies for cattle: lipid supplementation of diets. In: *Canadian Journal of Animal Science*, 87, p. 431-440.
- Carro M.D. and Miller E.L., 1999. Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semi-continuous culture system (Rusitec). In: *British Journal of Nutrition*, 82, p. 149-157.
- Czerkawski J.W., Blaxter K.L. and Wainman F.W., 1966. The metabolism of oleic, linoleic and linolenic acids by sheep with reference to their effects on methane production. In: *British Journal of Nutrition*, 20, p. 349-362.
- Czerkawski J.W. and Breckenridge G., 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). In: *British Journal of Nutrition*, 38, p. 371-384.
- Czerkawski J.W. and Breckenridge G., 1979. Experiments with the long-term rumen simulation technique (Rusitec); response to supplementation of basal rations. In: *British Journal of Nutrition*, 42, p. 217-228.
- Chalupa W., Rickabaugh B., Kronfeld D.S. and Sklan D., 1984. Rumen fermentation *in vitro* as influenced by long chain fatty acids. In: *Journal of Dairy Science*, 67, p. 1439-1444.

- Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge R.M. and Doreau M., 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. In: *Annales de Zootechnie*, 49, p. 181-205.
- Dewhurst R.J., Shingfield K.J., Lee M.R.F. and Scollan N.D., 2006. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. In: *Animal Feed Science and Technology*, 131, p. 168-206.
- Doreau M. and Ferlay A., 1994. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. In: *Animal Feed Science and Technology*, 45, p. 379-396.
- García-González R., López S., Fernández M. and González J.S., 2008. Dose-response effects of *Rheum officinale* root and *Frangula alnus* bark on ruminal methane production *in vitro*. In: *Animal Feed Science and Technology*, 145, p. 319-334.
- Getachew G., DePeters E.J., Robinson P.H. and Taylor S.J., 2001. *In vitro* rumen fermentation and gas production: influence of yellow grease, tallow, corn oil and their potassium soaps. In: *Animal Feed Science and Technology*, 93, p. 1-15.
- Giraldo L.A., Ranilla M.J., Tejido M.L. and Carro M.D., 2007. Influence of exogenous fibrolytic enzymes and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters. In: *British Journal of Nutrition*, 98, p. 753-761.
- Gómez-Cortés P., Frutos P., Mantecón A.R., Juárez M., de la Fuente M.A. and Hervás G., 2008. Milk production, conjugated linoleic acid content, and *in vitro* ruminal fermentation in response to high levels of soybean oil in dairy ewe diet. In: *Journal of Dairy Science*, 91, p. 1560-1569.
- Harris W.S. 2008. Linoleic acid and coronary heart disease. In: *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 79, p. 169-171.
- Hervás G., Luna P., Mantecón A.R., Castañares N., de la Fuente M.A., Juárez M. and Frutos P., 2008. Effect of diet supplementation with sunflower oil on milk production, fatty acid profile and ruminal fermentation in lactating dairy ewes. In: *Journal of Dairy Research*, 75, p. 399-405.
- Jalc D., Certik M., Kundrikova K. and Namestikova P., 2007. Effect of unsaturated C-18 fatty acids (oleic, linoleic and alpha-linolenic acid) on ruminal fermentation and production of fatty acid isomers in an artificial rumen. In: *Veterinarni Medicina*, 52, p. 87-94.
- Jalc D., Potkanski A., Szumacher-Strabel M., Kowalczyk J. and Cieslak A., 2006. The effect of a high concentrate diet and different fat sources on rumen fermentation *in vitro*. In: *Journal of Animal and Feed Sciences*, 15, p. 137-140.
- Jenkins T.C., 1993. Lipid metabolism in the rumen. In: *Journal of Dairy Science*, 76, p. 3851-3863.
- Johnson K.A. and Johnson D.E., 1995. Methane emissions from cattle. In: *Journal of Animal Science*, 73, p. 2483-2492.
- Kolver E.S., de Veht M.J., Roche J.R. and Chand, A., 2002. Enhancing ruminal concentrations of conjugated linoleic acid and transvaccenic acid. In: *Journal of Dairy Science*, 85 (Suppl.1), p. 183 (Abstr.).
- López S. and Newbold C.J., 2007. Analysis of methane. In: H.P.S. Makkar and PE Vercoe (eds), *Measuring Methane Production from Ruminants*. Dordrecht (Netherlands): Springer, p. 1-13.
- Luna P., Bach A., Juárez M. and de la Fuente, M.A., 2008. Influence of diets rich in flax seed and sunflower oil on the fatty acid composition of ewes' milk fat especially on the level of conjugated linoleic acid, n-3 and n-6 fatty acids. In: *International Dairy Journal*, 18, p. 99-107.
- Martin C., Rouel J., Jouany J.P., Doreau M. and Chilliard Y., 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. In: *Journal of Animal Science*, 86, p. 2642-2650.
- Palmquist D.L. and Jenkins T.C., 1980. Fat in lactation rations: review. In: *Journal of Dairy Science*, 63, p. 1-14.
- SAS, 2002. *User's Guide: Statistics (Release 8.02)* Cary, NC, USA: SAS Inst., Inc.
- Taylor K., 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 56, p. 49-58.
- Toral P.G., Belenguer A., Frutos P. and Hervás, G., 2009. Effect of the supplementation of a high-concentrate diet with sunflower and fish oils on ruminal fermentation in sheep. In: *Small Ruminant Research*, 81, p. 119-125.
- Van Soest P.J., Robertson J.B. and Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. In: *Journal of Dairy Science*, 74, p. 3583-3597.
- Weatherburn M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. In: *Analytical Chemistry*, 39, p. 971.
- Zhang C.M., Guo Y.Q., Yuan Z.P., Wu Y.M., Wang J.K., Liu J.X. and Zhu W.Y., 2008. Effect of octadeca carbon fatty acids on microbial fermentation, methanogenesis and microbial flora *in vitro*. In: *Animal Feed Science and Technology*, 146, p. 259-269.

ANEXO 8

Effect of Sunflower and Marine Oils on Ruminal Microbiota, *In vitro* Fermentation and Digesta Fatty Acid Profile

Julio E. Vargas^{1,2}, Sonia Andrés¹, Timothy J. Snelling^{1,3}, Lorena López-Ferreras^{1,4}, David R. Yáñez-Ruiz⁵, Carlos García-Estrada⁶ and Secundino López^{1*}

¹ Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), Departamento de Producción Animal, Universidad de León, León, Spain, ² Grupo CIENVET, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia, ³ Rowett Institute of Nutrition and Health, University of Aberdeen, Aberdeen, United Kingdom, ⁴ Department of Physiology/Metabolic Physiology, Institute of Neuroscience and Physiology, The Sahlgrenska Academy at the University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden, ⁵ Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, Spain, ⁶ INBIOTEC, Instituto de Biotecnología de León, León, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Antonio Faciola,
University of Nevada, Reno,
United States

Reviewed by:

Timothy Hackmann,
University of Florida, United States
Gwinyai Chibisa,
University of Idaho, United States

*Correspondence:

Secundino López
s.lopez@unileon.es

Specialty section:

This article was submitted to
Systems Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 03 February 2017

Accepted: 01 June 2017

Published: 20 June 2017

Citation:

Vargas JE, Andrés S, Snelling TJ, López-Ferreras L, Yáñez-Ruiz DR, García-Estrada C and López S (2017) Effect of Sunflower and Marine Oils on Ruminal Microbiota, *In vitro* Fermentation and Digesta Fatty Acid Profile. *Front. Microbiol.* 8:1124. doi: 10.3389/fmicb.2017.01124

This study using the rumen simulation technique (RUSITEC) investigated the changes in the ruminal microbiota and anaerobic fermentation in response to the addition of different lipid supplements to a ruminant diet. A basal diet with no oil added was the control, and the treatment diets were supplemented with sunflower oil (2%) only, or sunflower oil (2%) in combination with fish oil (1%) or algae oil (1%). Four fermentation units were used per treatment. RUSITEC fermenters were inoculated with rumen digesta. Substrate degradation, fermentation end-products (volatile fatty acids, lactate, gas, methane, and ammonia), and microbial protein synthesis were determined. Fatty acid profiles and microbial community composition were evaluated in digesta samples. Numbers of representative bacterial species and microbial groups were determined using qPCR. Microbial composition and diversity were based on T-RFLP spectra. The addition of oils had no effect on substrate degradation or microbial protein synthesis. Differences among diets in neutral detergent fiber degradation were not significant ($P = 0.132$), but the contrast comparing oil-supplemented diets with the control was significant ($P = 0.039$). Methane production was reduced ($P < 0.05$) with all oil supplements. Propionate production was increased when diets containing oil were fermented. Compared with the control, the addition of algae oil decreased the percentage C18:3 c9c12c15 in rumen digesta, and that of C18:2 c9t11 was increased when the control diet was supplemented with any oil. Marine oils decreased the hydrogenation of C18 unsaturated fatty acids. Microbial diversity was not affected by oil supplementation. Cluster analysis showed that diets with additional fish or algae oils formed a group separated from the sunflower oil diet. Supplementation with marine oils decreased the numbers of *Butyrivibrio* producers of stearic acid, and affected the numbers of protozoa, methanogens, *Selenomonas ruminantium* and *Streptococcus bovis*, but not total bacteria. In conclusion, there is a potential to manipulate the rumen fermentation

and microbiota with the addition of sunflower, fish or algae oils to ruminant diets at appropriate concentrations. Specifically, supplementation of ruminant mixed rations with marine oils will reduce methane production, the acetate to propionate ratio and the fatty acid hydrogenation in the rumen.

Keywords: microbial community composition, dietary fats, rumen microbiota, Rusitec fermenters, TRFLP, qPCR

INTRODUCTION

Fats are added to the diets of ruminant livestock to increase energy density of the ration. Dietary oil supplements can also be used to manipulate the microbial community and fermentation processes in the rumen (Huws et al., 2010). Specific microbial groups and their interactions play a key role in several aspects of livestock production including environmental impact (Steinfeld et al., 2006), meat and milk quality (Shingfield et al., 2013), efficiency of feed utilization (Myer et al., 2015), health and welfare (Nagaraja and Titgemeyer, 2007). Therefore, the use of oil supplements to manage the microbiota and thereby promote measureable benefits in these aspects is of great interest.

Fats and oils impair ruminal CH₄ production, and their inclusion in ruminant diets is considered by international agencies as one of the most feasible nutritional greenhouse gas (GHG) mitigation strategies (Bodas et al., 2012; Hristov et al., 2013). One of the global impacts on the environment from livestock agriculture is the release into the atmosphere of methane (CH₄). Methane is a GHG with 21 times the global warming potential of CO₂ (IPCC, 2007), and production from agricultural activity represents 10–12% of the total anthropogenic GHG equivalents per year (Gt CO₂ Eq/yr) (Smith et al., 2014). Methane is produced in the rumen by the Archaea and these microbes are often found in close association with species of bacteria and ciliate protozoa, which produce H₂ (Morgavi et al., 2010). However, beside the effects on methane emissions or methanogenic microbes, there is a need to demonstrate substrate degradability is not impaired (Hristov et al., 2013).

Oils from different sources may affect lipid metabolism in the rumen, and consequently the type of fatty acids absorbed in the intestine and subsequently present in the animal products. The fate of dietary oil supplements has been studied in depth and biohydrogenation pathways have been described in the reviews by Kim et al. (2009) and Lourenço et al. (2010). Milk and adipose fat obtained from ruminant livestock are sources of rumenic acid (C18:2 *c9t11*), an isomer of conjugated linoleic acid (CLA) that has been found to provide a number of benefits to human health (Bauman et al., 2005). *Butyrivibrio* spp. and related bacteria seem to be involved in producing CLA via the isomerization and biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the rumen (Wallace et al., 2006; Lourenço et al., 2010). Recently, other reports have shown that other bacterial groups may be involved in biohydrogenation processes, although their contribution depends upon the lipid source since the toxic nature of the double bond may differ among different fatty acids (Huws et al., 2015). Rumenic acid is synthesized as an intermediate of the conversion of unsaturated linoleic acid to the saturated stearic acid. Therefore, the inclusion of supplements

rich in PUFA in dietary rations, for example sunflower oil (ω -6-PUFA) or fish oil (ω -3-PUFA), could be used as an effective management practice to increase CLA in ruminant livestock products (Varadyova et al., 2008). Sunflower oil is rich in linoleic acid, the main precursor for the formation of CLA in the rumen. Fish and algae lipids are rich in long chain ω -3 PUFA (C20:5 ω -3 and C22:6 ω -3), and both have been considered suitable dietary supplements to provide essential long chain ω -3 PUFA and to increase their concentration in milk and meat (Korczyński et al., 2015). Fish oils or lipids contained in algae lessen the hydrogenation of fatty acids in the rumen then leading to the accumulation of unsaturated intermediates such as CLA (Wasowska et al., 2006). Thus, when diets are supplemented with fish or algae oils, dairy cows or sheep yield milk with higher contents in CLA (Shingfield et al., 2003). Supplementation of fattening lamb diets with algae oil increased C20:5 ω -3 and C22:6 ω -3 in meat to a greater extent than when the same diets were supplemented with fish oil (Cooper et al., 2004). Algae are increasingly used as a replacement for the commonly used fish oil (Stamey et al., 2012), reducing the problem of undesirable fishy smell and taste. In addition, algae are a valuable source of biological active, antioxidant and antimicrobial compounds (Korczyński et al., 2015). Technology for the cultivation of algae is rapidly developing given its productive (high yield of biomass), economic (production of food and feed, lipids, or biodiesel) and environmental (pollution prevention, wastewater treatment, detoxification of contaminants) benefits (Kouřimská et al., 2014; Wang et al., 2016).

When effects of dietary supplements have been investigated with the aim of manipulating the rumen microbiota to reduce environmental impact or improve the quality of the product, treatments should not adversely affect key species involved in the essential task of the breakdown of dietary fiber. *Butyrivibrio* spp. are important fiber-degrading bacteria (Maia et al., 2010). Prominent fiber-degraders (e.g., *Fibrobacter* and *Ruminococcus* spp.), and other dominant, nutritionally versatile groups (e.g., *Prevotella* spp.) should also be considered when a dietary supplement can potentially affect the composition of the rumen microbial community (Denman and McSweeney, 2006; Stevenson and Weimer, 2007). The balance of bacteria species is also responsible for the maintenance of a healthy ruminal pH. Therefore, it is of interest to examine if the addition of oils to the diet may affect lactate and volatile fatty acid (VFA) production and utilization.

There is a paucity of data measuring the effects of dietary oil supplements on other microbial species, particularly those with known roles in each of the several important aspects of rumen livestock agriculture described previously. Often, studies assessing the effects of lipid supplementation on rumen digestion do not address simultaneously impact on

diet degradation, anaerobic fermentation, including methane production, microbial protein synthesis, lipid metabolism, and shifts in key microbial species and the whole community structure. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of different types of marine oils used in combination with sunflower oil on rumen fermentation and the key microbial groups identified here. The experiment reported herein was carried out using an artificial rumen simulation technique (RUSITEC) (Czerkawski and Breckenridge, 1977), in which there is a precise control of the fermentation conditions and the aforementioned parameters can be measured in a single study.

MATERIALS AND METHODS

Cultures of mixed ruminal microorganisms were maintained in semi-continuous flow fermenters (RUSITEC) to simulate rumen conditions. Sixteen fermentation vessels were set up using two RUSITEC systems. The addition of sunflower oil combined with either algae or fish oils to the basal diet was examined. Control (CTR) treatment was the basal diet (Table 1) with no addition of oil. The supplemented oil treatments were prepared by adding to the control diet either 20 g sunflower oil/kg diet alone (SFL) or combined with 10 g/kg of fish oil (FSH) or algae oil (ALG) to a total oil concentration of 30 g/kg (3%; Table 1). Diets used as fermentation substrate were prepared every 3 days and stored at 4°C until needed. Four vessels (two in each RUSITEC system) were used for each experimental treatment.

Vessels were inoculated and operated daily following the general incubation procedure of Czerkawski and Breckenridge (1977) and described in detail by García-González et al. (2010). To inoculate the fermentation units of RUSITEC, rumen digesta was obtained from four ruminally fistulated Merino sheep fed a diet consisting (per kg) of 700 g grass hay and 300 g concentrate. Sheep care and handling followed the recommendations of the Directive 2003/65 for protection of animals used for experimental and other specific purposes. The Animal Ethics Committees of CSIC and University of Leon (Spain) had approved procedures for digesta sampling from sheep. Inoculum was prepared from 400 ml of strained rumen fluid diluted with 250 ml of McDougall artificial saliva (McDougall, 1948). In addition, particulate rumen contents (80 g) were sealed inside a nylon bag (100 µm pore size), which was placed into the feed container of each fermentation vessel.

The dietary fermentation substrate was weighed (15 g dry matter) into a nylon bag, which was sealed and placed into the vessel feed container with the bag of strained rumen digesta. Incubation was started with temperature maintained at 37°C and a continuous infusion of McDougall artificial saliva (pH 8.4) at a rate of 556 ml/day (dilution rate of 3.6%/h) per vessel.

After the first 24 h of incubation, the bags with rumen contents were replaced by others with 15 g fermentation substrate. After 48 h the bag containing the original fermentation substrate was replaced. This procedure was repeated every 24 h replacing the bag containing the 48-h fermentation residue. Thus, every day in the feed container there was one bag with undigested residue

TABLE 1 | Ingredients and chemical composition of control and oil supplemented diets.

Treatment	Control	Sunflower oil	Sunflower and fish oil	Sunflower and marine algae
INGREDIENTS (g/kg DRY MATTER)				
Cracked corn grain	250	245	243	243
Barley grain	150	147	146	146
Soybean meal	200	196	194	194
Lucerne hay	200	196	194	194
Beet pulp	100	98	97	97
Molasses	55	54	53	53
Sodium bicarbonate	15	15	15	15
Calcium carbonate	14	14	14	14
Dicalcium phosphate	6	6	6	6
Mineral vitamin premix	5	5	5	5
Marine salt	5	5	5	5
Sunflower oil	–	20	20	20
Fish oil	–	–	10	–
Algae marine oil	–	–	–	10
COMPOSITION (g/kg DRY MATTER)				
Organic matter	896	895	894	894
Crude protein	191	189	184	185
Neutral detergent fiber	354	390	364	368
Acid detergent fiber	139	145	141	142
Ether extract	16.0	37.2	47.3	48.9
DIETARY FATTY ACID (FA) PROFILE (AS % OF TOTAL FA)				
C14:0	1.09	0.60	1.30	1.78
C16:0	20.9	14.7	15.1	15.4
Total C18	76.3	82.8	72.2	66.7
C20:5ω3			1.35	0.27
C22:5ω6			0.28	3.73
C22:6ω3			4.05	8.85
C24:0				0.34
Otros	1.20	1.33	5.04	2.44
DIETARY C18 FA (AS % OF TOTAL C18 FA)				
C18:0	3.8	5.0	6.5	5.2
C18:1 c9	31.8	36.4	38.2	36.6
C18:2 c9c12	50.1	52.0	48.2	51.6
18:3 c9c12c15	14.3	6.7	7.2	6.6

Fatty acid profile of oils (as % of total fatty acids).

Sunflower oil: 8.7% C16:0, 5.3% C18:0, 35.6% C18:1ω9 c9, 47.3% C18:2ω6 c9c12, 0.3% C18:3ω3 c9c12c15.

Fish oil: 4.1% C14:0, 16.6% C16:0, 6.8% C18:0, 17.5% C18:1ω9 c9, 2.3% C18:2ω6 c9c12, 3.8% C18:3ω3 c9c12c15, 6.6% C20:5ω3 c5c8c11c14c17, 1.4% C22:5ω6 c4c7c10c13c16, 19.9% C22:6ω3 c4c7c10c13c16c19.

Algae oil: 6.4% C14:0, 18.4% C16:0, 1.0% C18:0, 1.8% C18:1ω9 c9, 0.5% C18:2ω6 c9c12, 0.1% C18:3ω3 c9c12c15, 1.7% C24:0, 1.3% C20:5ω3 c5c8c11c14c17, 18.3% C22:5ω6 c4c7c10c13c16, 43.5% C22:6ω3 c4c7c10c13c16c19.

after 48-h of incubation and another bag with a 24-h incubation residue.

Experimental Protocol: Sampling and Measurements

Sampling procedures were as described in detail by García-González et al. (2010). After a preliminary period of 6 days to reach steady state conditions, a measurement period started and lasted for 11 days (days 7–17). Samples to determine digestibility (as substrate disappearance from the bag) and fermentation end-products (VFA, lactate, gas, methane, and ammonia production) were collected on days 7, 8, 9, 14, 15, and 16 of the experiment.

Liquid effluent was collected in flasks to which 20 mL of 75 mM sulfuric acid had been added. Volume of effluent was measured daily and a sample (about 50 mL) was directly frozen (-18°C) for later ammonia, lactate and VFA analysis. Gas was collected in Tecator gas sampling bags (Tecobag, Tesseraux Container, Germany) and volume was measured by emptying the bags with a vacuum pump connected to a flow meter (Ritter Apparatebau, Germany). A rubber septum was incorporated into the tubing for taking a sample using a syringe, and samples were kept in 10 mL vacuum tubes (Venoject[®], Terumo Europe, Belgium).

On day 9, $(^{15}\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (95% enriched, Sigma, Madrid, Spain) was added into each vessel to dose 2.18 mg ^{15}N to instantly label the $\text{NH}_3\text{-N}$ pool, and a solution of $(^{15}\text{NH}_4)\text{SO}_4$ was added to the artificial saliva to reach a daily infusion rate of 4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ dietary N. The total effluent and the contents of the nylon bag collected from each vessel on day 12 were thoroughly mixed and homogenized in a blender and used to obtain a representative sample of total digesta and to isolate a microbial pellet following the procedures of Carro and Miller (1999). Non-ammonia N and ^{15}N enrichment were determined in finely ground samples of total digesta and microbial pellets to estimate microbial N output.

On day 17, samples of digesta were collected from each vessel, and consisted of 30 mL of liquid content of the fermentation vessel, 1.5 g of fermentation residue from the 48-h bag, and 1.5 g of fermentation residue from the 24-h bag. The samples were mixed thoroughly, immediately frozen at -80°C and freeze-dried. Then, each sample was divided in two fractions. One portion was used for lipid extraction and fatty acid analysis. The other portion was homogenized by bead beating for 1 min (BioSpec Products) and used for DNA extraction using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's protocol with the exception of using a higher temperature (95°C) at the lysis step, required for cells that are difficult to lyse (such as some ruminal bacteria). DNA samples were used as templates for quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) amplification and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis.

At the end of the experiment, the vessel liquid contents were used to inoculate batch cultures to determine fermentation gas production kinetics as indicator of the fermentative activity in each vessel.

Chemical Analyses

Proximate composition (moisture, ash, crude protein, ether extract, neutral, and acid detergent fiber) was determined using the analytical methods described by García-González et al. (2010). Methane in fermentation gas and VFA in effluent were determined by gas chromatography, ammonia nitrogen and lactate in effluent samples by colorimetry, and non-ammonia N and ^{15}N enrichment in digesta and microbial pellets by isotope ratio mass spectrometry according to the methods described in detail by García-González et al. (2010). Fatty acid profile in samples of rumen digesta were determined according to Morán et al. (2013).

T-RFLP and qPCR Analysis

Total bacterial DNA was amplified by PCR using universal bacterial fluorescein-labeled oligonucleotide probes, forward primer 12f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3') and reverse primer 1492r (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'; Hongoh et al., 2003). The labeled PCR products were purified using GFX PCR DNA and Gel Band Purification kits (GE Healthcare, Madrid, Spain) and quantified. Each DNA sample (100 ng) was digested for 12 h at 37°C with the restriction enzymes *HhaI*, *HaeIII*, and *MspI*. The terminal restriction fragments (TRFs) were analyzed by capillary electrophoresis on an automatic sequence analyzer (MegaBACE 500, GE Healthcare) with internal Et-ROX labeled DNA size standards (Amersham Biosciences, GE Healthcare).

Finally, the allele report table generated by the Gene Marker program was used to calculate the relative height of each peak for each sample, then these data were analyzed by principal component analysis (PCA). The matrix of relative height of peaks detected from TRFs was used to calculate richness and diversity indices as described by Hill et al. (2003) and Lemos et al. (2011).

Quantitative real-time PCR was carried out using the Applied Biosystems StepOne PlusTM Real Time PCR system (Applied Biosystems) using SYBR Green Supermix (Takara Bio Inc.) as described in Maeda et al. (2003). All reactions were performed in triplicate, using 10 μL of qPCR mix, 2 μL of DNA template, a variable volume (ranging between 0.5 and 2 μL , depending on the species or microbial group) of 10 μM solutions of each primer, and then adding PCR water up to a total volume of 20 μL per single reaction.

Primers were selected (Table 2) targeting the rRNA gene, specifically the 16S subunit for the bacteria and the 18S subunit for the ciliates and 18S and ITS1 for fungi. The methanogenic archaea were detected using primers targeting the methyl coenzyme-M reductase gene (*mcrA*) (Denman et al., 2007).

Quantitative PCR analysis of the *Butyrivibrio* SA-producing bacteria [or *B. proteoclasticus* group including the species causing a complete hydrogenation of unsaturated 18 C fatty acids to stearic acid (SA)] was carried out using the molecular beacon approach with the primers and probe designed by Paillard et al. (2007) (Table 2).

Standards used for copy number calculations were prepared using a plasmid vector containing the respective PCR amplicon sequence of each of the microbial groups. The use of plasmids as PCR standards are described in detail by Andrés et al. (2016). The identity of the standard amplicons were verified by sequencing the plasmid insert and confirming sequence identity using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Fermentative Activity

On the last experimental day, batch cultures were inoculated with the liquid contents of the vessels for studying the kinetics of gas production in the different inocula upon specific incubation of different substrates. The substrates used were cellulose (Sigmacell[®], Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, Spain), corn starch (Calbiochem[®], Merck, Germany), and the same mixed substrate used in the Rusitec vessels (CTR diet, Table 1), ground

TABLE 2 | Primers used for qPCR and T-RFLP.

Primer	Sequence (5'–3')	Target	References
qPCR			
TotBacF	GTGSTGCAYGGYTGTCTGCA	Total Bacteria	Maeda et al., 2003
TotBacR	ACGTCRTCCMCACCTTCCTC		
qmcra-F	TTCGGTGGATCDCARAGRGC	Methanogens	Denman et al., 2007
qmcra-R	GBARGTCGAWCCGCTAGAATCC		
316f	GCTTTCGWGTGAGTGTATT	Ciliate protozoa	Sylvester et al., 2004
539r	CTTGCCCTCYAATCGTWCT		
fwd	GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC	Anaerobic fungi	Denman and McSweeney, 2006
rev	CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT		
PrF	GGTTCTGAGAGGAAGGTCCCC	<i>Prevotella</i> spp.	Stevenson and Weimer, 2007
PrR	TCCTGCACGCTACTTGGCTG		
FbsF	GGAGCGTAGGCGGAGATTCA	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Khafipour et al., 2009
FbsR	GCCTGCCCTGAACATCCA		
SrF	CAATAAGCATTCCGCTGGG	<i>Selenomonas ruminantium</i>	Stevenson and Weimer, 2007
SrR	TTCACTCAATGTCAAGCCCTGG		
RaF	TGTTAACAGAGGGAAGCAAAGCA	<i>Ruminococcus albus</i>	Stevenson and Weimer, 2007
RaR	TGCAGCCTACAATCCGAACATA		
MeF	GACCGAAACTGCGATGCTAGA	<i>Megasphaera</i> spp.	Ouwerkerk et al., 2002
MeR	CGCCTCAGCGTCAGTTGTC		
MeProbe	TCCAGAAAGCCGCTTTCGCCACT		Blanch et al., 2009
SbF	GATAGCTAATACCGCATAACAGCATT	<i>Streptococcus bovis</i>	Moya et al., 2009
SbR	AACGCAGGTCCATCTACTAGTGAA		
SbProbe	TGCTCCTTTCAAGCAT		
ScF	TGGGAAGCTACCTGATAGAG	<i>Succinivibrio</i> spp.	Tajima et al., 2001
ScR	CCTTCAGAGAGGTTCTCACT		
VAf	GCCTCAGCGTCAGTAATCG	<i>Butyrivibrio</i> VA (vaccenic acid producers)	Shingfield et al., 2012
VAr	GGAGCGTAGGCGTTTTAC		
SAf	TCCGGTGGTATGAGATGGGC	<i>Butyrivibrio</i> SA (stearic acid producers)	Paillard et al., 2007
Sar	GTCGCTGCATCAGAGTTTCCT		
MBP*	CCGCTTGGCCGTCCGACCTCTCAGTCCGAGCGG		
B395f	GYGAAGAAGTATTTCCGTAT	<i>Butyrivibrio</i> group	Boeckert et al., 2008
B812r	CCAACACCTAGTA TTCATC		
T-RFLP			
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Universal bacteria	Hongoh et al., 2003
1389r	ACGGGCGGTGT GTACAAG		

*Molecular beacon probe.

to 1 mm. On day 17, bags of substrate were withdrawn and liquid was kept in the vessels, which were closed and left at 39°C for 4 h. Meanwhile, 500 mg of DM of the substrates were weighed into 120 mL serum bottles. Then, the fluid of each RUSITEC vessel was anaerobically dispensed into each serum bottle (50 mL each), inoculating two bottles per substrate and two blank bottles (without any substrate), which were sealed and crimped, and then incubated at 39°C for 92 h. No additional buffer was added to the bottles. Gas production was measured using a pressure transducer (Theodorou et al., 1994) at 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 29, 34, 44, 56, 68, 80, and 92 h. Nonlinear regression was performed using PROC NLIN of SAS to fit the exponential model of France et al. (2000) to cumulative gas production data:

$$G = A \left[1 - e^{-k_d(t-L)} \right], \quad (1)$$

where G is cumulative gas production (mL/g) at incubation time t (h), A is the asymptotic gas production (mL/h), k_d is the fractional fermentation rate (h^{-1}), and L is the lag time (h). From this equation, estimations were obtained for gas produced at 24 h (G_{24} , mL/g), and average gas production rate (R , mL/g h^{-1}) between inoculation and time at which gas production was equal to half of A (France et al., 2000).

Statistical Analysis

Measurements taken on several days were averaged for each vessel. Data were analyzed using the SAS program (SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.3 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.) with ANOVA using a randomized complete block design. Within each experiment, treatments were randomly assigned to two vessels of each RUSITEC system, thus giving four

replicates per treatment. Each vessel (fermentation unit) was an experimental unit, and the RUSITEC system was the blocking factor. The statistical model was:

$$y_{ijk} = \mu + B_i + O_j + \varepsilon_{ijk} \quad (2)$$

where y_{ijk} is the value for an individual observation, μ the overall mean, B_i the effect of the blocking factor (i = RUSITEC system 1 or 2), O_j is the fixed effect of oil treatment (j = 1...4; CTR, SFL, FSH, or ALG), and ε_{ijk} is the residual error. The random effect was fermentation vessel k within treatment (j) and block (i). Statistical significance was declared at $P < 0.05$ and $P < 0.10$ was considered a tendency. Multiple comparisons of means among oil sources were performed using Tukey's test.

Similarity and grouping of treatments based on T-RFLP spectra were assessed using cluster and principal components analyses.

RESULTS

There were no significant differences ($P > 0.05$) in ruminal pH between diets, although average pH was significantly decreased ($P = 0.027$) when the diet was supplemented with an oil. The addition of oils had no apparent effect on substrate degradation (assessed by measuring disappearance from the nylon bags containing the incubated diet), except for fat digestibility, which was higher ($P < 0.001$) when oil was added to the diet. Furthermore, fat digestibility was increased ($P = 0.010$) when a marine oil was supplemented compared with the diet containing only sunflower oil. There were no significant differences among the four diets in neutral detergent fiber (NDF) digestibility ($P = 0.132$), but the contrasting comparison of the CTR diet with average of all treatments supplemented with an oil (SFL, FSH, and ALG diets) reached the level of statistical significance ($P = 0.039$). Methane production was consistently reduced ($P < 0.05$) when oil supplements were added to the diet (Table 3). Total VFA

TABLE 3 | Effects of oils added to the diet on ruminal fermentation in RUSITEC fermenters.

Item	Control (CTR)	Sunflower oil (SFL)	SFL + Fish oil	SFL + Marine algae	SEM (n = 4)	P-value	P-value contrast CTR vs. OIL	P-value contrast SFL vs. MARINE
Effluent, mL/d	594	585	628	591	19.9	0.458	0.786	0.346
pH	6.78	6.73	6.74	6.72	0.015	0.100	0.027	0.892
DISAPPEARANCE COEFFICIENTS, g DIGESTED/100 g INCUBATED								
Dry matter	73.3	73.0	73.1	73.7	1.05	0.958	0.973	0.768
Organic matter	72.7	72.2	72.3	73.1	1.10	0.926	0.939	0.705
Neutral detergent fiber	53.5	57.2	56.2	55.3	1.00	0.132	0.039	0.340
Acid detergent fiber	27.9	28.6	30.8	28.9	1.51	0.596	0.415	0.526
Crude protein	70.6	72.3	71.2	72.8	1.50	0.754	0.455	0.863
Ether extract	65.4 ^b	81.5 ^a	85.0 ^a	88.9 ^a	2.43	0.002	<0.001	0.010
FERMENTATION GAS PRODUCTION								
Total gas, L/d	3.03	2.95	3.05	2.91	0.086	0.658	0.583	0.784
CH ₄ , L/d	0.265 ^a	0.222 ^{ab}	0.207 ^b	0.211 ^b	0.0101	0.008	<0.001	0.355
CH ₄ , mL/100 mL total gas	8.98 ^a	7.86 ^b	7.54 ^b	7.23 ^b	0.226	0.002	<0.001	0.124
CH ₄ , mmol/g FOM	1.20 ^a	1.01 ^{ab}	0.94 ^b	0.94 ^b	0.050	0.011	0.002	0.334
VOLATILE FATTY ACID (VFA, mmol/d)								
Acetate	25.5	27.4	26.5	26.7	0.49	0.175	0.061	0.257
Propionate	6.94 ^c	7.38 ^{bc}	8.36 ^{ab}	8.46 ^a	0.176	<0.001	<0.001	0.002
Butyrate	8.30	8.87	8.81	8.51	0.210	0.297	0.144	0.433
Valerate	2.56 ^c	2.88 ^b	3.19 ^a	3.04 ^{ab}	0.053	<0.001	<0.001	0.006
Isoacids	2.24	2.29	2.46	2.41	0.063	0.075	0.060	0.070
Total VFA	47.8 ^b	51.3 ^a	51.4 ^a	51.3 ^a	0.83	0.055	0.008	0.966
Acetate:propionate ratio	3.72 ^a	3.54 ^{ab}	3.19 ^b	3.18 ^b	0.099	0.012	0.009	0.014
L-lactate, mg/d	9.1 ^c	10.1 ^{bc}	14.0 ^a	13.5 ^{ab}	0.81	0.003	0.004	0.004
Ammonia N, mg/d	171	156	171	165	4.2	0.140	0.211	0.062
Microbial protein, g/d	1.39	1.35	1.41	1.37	0.072	0.924	0.894	0.638
Microbial protein, g/100 g FOM	14.1	13.7	14.3	13.7	0.75	0.919	0.842	0.728

CTR, Control diet; SFL, control diet supplemented with 2% sunflower oil; SFL + fish oil, control diet supplemented with 2% sunflower oil + 1% fish oil; SFL + algae oil, control diet supplemented with 2% sunflower oil + 1% algae oil.

SEM, Standard error of the mean.

Contrast CTR vs. OIL: comparison between CTR and all treatments supplemented with oil.

Contrast SFL vs. MARINE: comparison between SFL and treatments supplemented with marine oils.

FOM, Fermentable organic matter.

^{a,b}Within a row, mean values without common superscript letters differ ($P < 0.05$).

production was increased when diets containing supplementary oil were fermented, mainly as result of the increase in propionate and valerate production (Table 3). Propionate production was significantly increased ($P < 0.05$) when diets supplemented with marine oils were fermented compared with the control, resulting in a reduced acetate to propionate ratio (Table 3). Lactate production was also increased in diets with marine oils compared with the control diet. The additions of oils to the diet did not affect ammonia or microbial protein synthesis.

The addition of oil to the diet gave rise to variations in the digesta fatty acid profile, changing the proportions of C14:0 (greater with ALG than with CTR or SFL diets), C16:0 (lower with SFL and FSH than with CTR diet), total C18 (greater with SFL than with ALG diets), and C20 and C22 PUFA (only present in treatments supplemented with marine oils; Table 4). Compared with CTR diet, the addition of algae decreased the

percentage of C18:3 c9c12c15 in rumen digesta. The percentage of C18:2 c9t11 was increased and that of C18:2 t10c12 was decreased when the control diet was supplemented with an oil (Table 4). Ruminal biohydrogenation of C18 fatty acids was calculated according to Wu and Palmquist (1991). Compared to the CTR diet, the addition of sunflower and fish oils (FSH treatment) reduced the hydrogenation of C18 PUFA (C18:2 c9c12 and C18:3 c9c12c15) and increased the hydrogenation of C18:1 c9. Biohydrogenation of C18:3 c9c12c15 was greater with FSH than with ALG diets, and that of C18:2 c9c12 was higher with FSH than with any of the other diets tested. The addition of fish oil or algae with sunflower oil to the CTR diet resulted in a decrease of the overall hydrogenation of C18 unsaturated fatty acids. There were no differences among treatments supplemented with oils (SFL, FSH, or ALG diets) in total C18 fatty acid biohydrogenation.

There were no differences among inocula from RUSITEC vessels fed the different diets in the fermentation of the control

TABLE 4 | Effects of oils added to the diet on ruminal digesta fatty acid (FA) profile and C18 fatty acid biohydrogenation in RUSITEC fermenters.

Item	Control (CTR)	Sunflower oil (SFL)	SFL + Fish oil	SFL + Marine algae	SEM (n = 4)	P-value	P-value contrast CTR vs. OIL	P-value contrast SFL vs. MARINE
DIGESTA FATTY ACIDS (AS % of TOTAL FA)								
C14:0	2.01 ^b	1.92 ^b	2.53 ^{ab}	3.01 ^a	0.160	0.011	0.091	0.008
C14:1	1.41	1.34	1.16	1.35	0.165	0.940	0.622	0.840
C15:0	1.59	1.17	1.50	1.38	0.163	0.350	0.256	0.204
C15:1	0.439	0.300	0.452	0.318	0.059	0.210	0.250	0.288
C16:0	22.8 ^a	17.8 ^b	18.2 ^b	20.1 ^{ab}	0.88	0.012	0.003	0.241
C16:1	4.09 ^a	3.83 ^{ab}	4.59 ^a	3.19 ^b	0.185	0.006	0.281	0.965
Total C18 FA	62.0 ^{ab}	66.5 ^a	64.1 ^{ab}	59.1 ^b	1.53	0.041	0.535	0.029
C20:5n3	0.0 ^b	0.0 ^b	0.50 ^a	0.42 ^a	0.117	0.017	0.045	0.008
C22:6n3	0.0 ^b	0.0 ^b	1.32 ^a	1.59 ^a	0.198	<0.001	0.002	<0.001
Others	6.29	6.18	7.09	6.48	0.788	0.854	0.733	0.562
C18 FA PROFILE (AS % of TOTAL C18 FA)								
C18:0	17.5	15.1	13.4	14.4	1.45	0.390	0.126	0.550
C18:1 t11	2.23	2.33	1.87	2.76	0.674	0.874	0.903	0.992
C18:1 c9	29.5	29.6	27.6	31.6	1.47	0.340	0.907	0.975
C18:1 c11	4.63	3.47	4.49	3.04	0.449	0.077	0.088	0.611
C18:2 c9c12	31.2	40.6	40.3	40.8	2.95	0.139	0.028	0.716
C18:3 c6c9c12	0.30	0.25	0.34	0.33	0.040	0.401	0.944	0.102
C18:3 c9c12c15	5.62 ^a	4.36 ^{ab}	5.25 ^{ab}	4.08 ^b	0.328	0.038	0.024	0.513
C18:2 c9t11	0.049 ^b	0.275 ^a	0.337 ^a	0.343 ^a	0.029	<0.001	<0.001	0.105
C18:2 t10c12	0.391 ^a	0.276 ^b	0.298 ^{ab}	0.291 ^{ab}	0.022	0.043	0.008	0.623
Others	2.18	2.00	1.81	1.74	0.198	0.472	0.205	0.421
BIOHYDROGENATION %								
C18:3 c9c12c15	52.7 ^a	34.4 ^{ab}	27.1 ^b	38.3 ^a	3.91	0.012	0.004	0.733
C18:2 c9c12	34.7 ^a	29.8 ^a	8.5 ^b	24.7 ^a	2.96	0.009	0.019	0.024
C18:1 c9	6.5 ^b	21.2 ^{ab}	27.7 ^a	13.5 ^{ab}	4.17	0.040	0.028	0.917
Total C18 biohydrogenation	27.3 ^a	21.3 ^{ab}	17.3 ^b	18.9 ^b	1.89	0.027	0.006	0.260

CTR, Control diet; SFL, control diet supplemented with 2% sunflower oil; SFL + fish oil, control diet supplemented with 2% sunflower oil + 1% fish oil; SFL + algae oil, control diet supplemented with 2% sunflower oil + 1% algae oil.

SEM, Standard error of the mean.

Contrast CTR vs. OIL: comparison between CTR and all treatments supplemented with oil.

Contrast SFL vs. MARINE: comparison between SFL and treatments supplemented with marine oils.

^{a,b}Within a row, mean values without common superscript letters differ ($P < 0.05$).

diet or cellulose (Table 5). In contrast, fermentation kinetics of starch showed that the addition of fish or algae oils had a slight inhibitory effect on microbial amylolytic activity in the rumen (Table 5).

Both cluster analysis (Figure 1) and PCA (Figure 2) showed clear discrimination between microbial profiles in the vessels fed CTR or SFL diets and those receiving the FSH or ALG diets. Treatments were clearly separated along the factor 1 (explaining up to 19% of the variance), indicating that this principal component would reflect the effects of dietary oil addition on microbial composition. The fragments with a greatest contribution to this principal component were identified and the differences between treatments in these fragments were examined. A theoretical assignment of the more eccentric TRFs to compatible bacterial species was performed using the tap-trFLP tool of the Ribosomal Data Project (Cole et al., 2003). Based on this analysis it would seem that supplementation with FSH and ALG would increase bacteria belonging to genera *Fibrobacter* and *Prevotella*, and would reduce abundance of bacteria of *Butyrivibrio*, *Ruminococcus*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Lachnospira*, and *Streptococcus* genera. The supplementation of the control diet with oils did not significantly affect measurements of species richness or diversity (Table 6) or total bacterial numbers (Figure 3A). The specific microbial groups affected by the addition of oils are shown in Figures 3A–C. The addition of sunflower oil alone had no effect ($P > 0.05$) on any of the microbial groups examined. This effect

on the *Butyrivibrio* SA numbers was also seen when the diet was further supplemented with fish or algae oils (Figure 3A). The diets supplemented with fish and algae oils increased the numbers of ciliate protozoa and reduced the counts of methanogenic archaea (Figure 3B), although the decreased in methanogens was only significant with the ALG diet. Diets FSH and ALG increased the abundance of *Selenomonas ruminantium*, and ALG diet also decreased the presence of *Streptococcus bovis* (Figure 3C). No other significant diet effects were observed on any of the other microbial groups quantified by qPCR.

DISCUSSION

If supplementation of dietary oils in ruminant livestock diets can provide even small improvements in terms of more efficient production, better health and welfare of the animal or reduction of environmental impact, then there are clear benefits to their use. This study measured the changes in rumen fermentation and microbial community composition, in particular in prominent microbial groups associated with key aspects of ruminant livestock production, in response to the supplementation of the diet with different combinations of sunflower and fish oil as well as a marine algae based product. Microbial communities were examined in digesta samples obtained from fermenters in which ruminal fermentation is simulated *in vitro*, characterized by a precise control of inputs (feed and saliva) to and outputs

TABLE 5 | Effects of oils added to the diet on fermentative activity in RUSITEC fermenters.

Item	Control (CTR)	Sunflower oil (SFL)	SFL + Fish oil	SFL + Marine algae	SEM (n = 4)	P-value	P-value contrast CTR vs. OIL	P-value contrast SFL vs. MARINE
CONTROL DIET								
Asymptotic gas production, mL/g	321	321	312	328	9.3	0.676	0.903	0.914
Fractional fermentation rate, h ⁻¹	0.050	0.049	0.055	0.051	0.0024	0.324	0.695	0.205
Lag time, h	1.3	1.4	1.7	1.6	0.26	0.456	0.179	0.429
Average fermentation rate, mL/h	10.6	10.4	10.9	10.6	0.46	0.820	0.764	0.458
Gas production at 24 h, mL/g	217	215	220	221	7.1	0.936	0.955	0.537
STARCH								
Asymptotic gas production, mL/g	414	419	400	422	15.8	0.780	0.980	0.704
Fractional fermentation rate, h ⁻¹	0.111	0.107	0.104	0.096	0.0054	0.270	0.184	0.264
Lag time, h	2.2 ^b	3.0 ^{ab}	3.5 ^{ab}	5.1 ^a	0.51	0.012	0.016	0.061
Average fermentation rate, mL/h	24.7 ^a	22.2 ^{ab}	20.1 ^b	18.1 ^b	1.04	0.006	0.003	0.035
Gas production at 24 h, mL/g	377	374	347	346	11.1	0.132	0.120	0.067
CELLULOSE								
Asymptotic gas production, mL/g	388	384	356	382	23.3	0.760	0.627	0.604
Fractional fermentation rate, h ⁻¹	0.046	0.048	0.051	0.047	0.044	0.924	0.661	0.886
Lag time, h	14.9	15.3	16.6	16.0	1.53	0.859	0.534	0.619
Average fermentation rate, mL/h	6.6	6.4	5.9	6.1	0.40	0.603	0.345	0.374
Gas production at 24 h, mL/g	122	122	100	112	16.2	0.753	0.590	0.432

CTR, Control diet; SFL, control diet supplemented with 2% sunflower oil; SFL + fish oil, control diet supplemented with 2% sunflower oil + 1% fish oil; SFL + algae oil, control diet supplemented with 2% sunflower oil + 1% algae oil.

SEM, Standard error of the mean.

Contrast CTR vs. OIL: comparison between CTR and all treatments supplemented with oil.

Contrast SFL vs. MARINE: comparison between SFL and treatments supplemented with marine oils.

^{a,b}Within a row, mean values without common superscript letters differ ($P < 0.05$).

(fermentation end-products) from the system, and of the fermentation conditions (e.g., pH, temperature). The use of live animals was avoided by maintaining the microbial communities in a simulated rumen environment.

The diversity of the total bacterial community was measured using T-RFLP. Richness and diversity of species were not affected by the supplementation with SFL either with or without the addition of the fish oil and marine algae. In both the clustering and principal component analyses, the RUSITEC vessels formed groups separate from the effects of the treatment. This effect was considered a normal effect of the variability in the microbial community between systems. For instance, in the case of the vessels receiving only SFL (2%), the treatment effect was not as strong as the system effect. However, the samples containing the additional 1% fish oils or algae formed a group separated from the SFL only and control treatments. A similar discrimination of bacteria community composition has been reported in rumen fluid obtained from sheep supplemented with different combinations of 2% sunflower and/or 1% fish oil (Belenguer et al., 2010). Significant effects on the bacterial community have been detected when grass or red clover silage diets were supplemented with 0, 1, 2, or 3% fish oil, but with a minor effect on richness of species (Huws et al., 2010). Diets supplemented only with 2.5% sunflower oil, or with this plant oil plus incremental amounts (0.8, 1.6, or 2.4%) of marine algae were clustered according to the ruminal bacterial composition (Toral et al., 2012) in a comparable grouping as in our study.

Analysis by qPCR of the individual species and microbial groups proved a more sensitive measurement of the effects of the different oils. The addition of 2% SFL with or without additional 1% FSH and ALG caused a non-significant fold reduction in the copy number of total bacteria relative to the control. This result was broadly reflected in the results measuring the total microbial protein synthesis (g/d). An inhibitory effect of oils on rumen bacteria has been reported in a number of studies *in vivo* (Vargas-Bello-Pérez et al., 2016) and *in vitro* pure cultures (Maia et al., 2010) although in these cases, a higher dose may have contributed to a greater effect.

General bacterial diversity and abundance measured by T-RFLP agreed with the rumen fermentation results. Substrate degradation was not affected and total VFA production was increased by the addition of oils to the diet. The addition of fat to ruminant diets has been previously associated with a reduction of feed digestibility, in particular of fiber degradation (Palmquist and Jenkins, 1980). This effect has been attributed to changes in the microbial communities, a reduction in fermentative activity or the limitation of the access of microbes and enzymes to feed particles due to physical coating (Nagaraja et al., 1997). In our study, bacterial groups involved in fiber degradation were not substantially modified. *Ruminococcus albus* showed a small increase in copy number, and the dominant ruminal fibrolytic bacteria *Fibrobacter succinogenes* was not significantly affected by oil supplementation. Hence, the ability to breakdown dietary fiber in the rumen was not negatively affected by the addition of oils at the doses used in these experiments (Denman and

FIGURE 2 | Principal components plot derived from the analysis of T-RFLP data showing the discrimination along principal components 1 and 2 of RUSITEC bacterial communities provided with either control diets (CTR) or diets supplemented with 2% sunflower oil (SFL) oil, sunflower oil with 1% fish oil (FSH) or sunflower oil and 1% marine algae (ALG). The number after the treatment code indicates the RUSITEC system (there were two RUSITEC systems and two replicates of each treatment in each system).

TABLE 6 | Diversity indices of the RUSITEC bacteria community provided with control diets, or diets containing sunflower oil only, or sunflower oil with algae or fish oil supplementation.

Index	Control (CTR)	Sunflower oil (SFL)	SFL + Fish oil	SFL + Marine algae	SEM (n = 4)	P-value	P-value contrast CTR vs. OIL
Species richness, S	84.8	80.5	78.3	65.8	8.73	0.418	0.320
Shannon's diversity index, H'	3.78	3.73	3.64	3.49	0.128	0.280	0.250
Shannon's evenness index, E	0.855	0.849	0.836	0.848	0.016	0.834	0.484
Simpson's diversity index, D	0.043	0.050	0.056	0.061	0.0092	0.397	0.222
Index of diversity, 1-D	0.957	0.950	0.944	0.939	0.0092	0.397	0.214
Number of species accounting for 50% total relative peak height	6.3	5.5	5.0	4.0	1.54	0.608	0.375
Number of species accounting for 70% total relative peak height	14.0	13.5	12.0	10.5	2.65	0.596	0.440

CTR, Control diet; SFL, control diet supplemented with 2% sunflower oil; SFL + fish oil, control diet supplemented with 2% sunflower oil + 1% fish oil; SFL + algae oil, control diet supplemented with 2% sunflower oil + 1% algae oil.

SEM, standard error of the mean.

Contrast CTR vs. OIL: comparison between CTR and all treatments supplemented with oil.

McSweeney, 2006). In concordance with these observation, the fermentative activity on pure substrates (cellulose or starch) assessed by gas production kinetics was not affected when the different fat supplements studied were added to the control diet. The amount and type of lipid added (Jenkins, 1993) may explain the discrepancy of the effects of oil addition on bacteria numbers and substrate degradation observed in our study with others reported in the literature. With levels

of added oils similar to that used in our study, Doreau et al. (2009) concluded that organic matter fermentation in the rumen was not affected. In a recent meta-analysis, Weld and Armentano (2017) showed that the inclusion of fats to dairy cow diets did not affect total tract and ruminal fiber digestibility. Patra (2014) concluded that fiber digestibility was only adversely affected when fat was added to sheep diets at high concentrations. Also in agreement with our study, Gao

et al. (2016) observed an increase in VFA concentration in batch cultures of mixed ruminal microorganisms fed with substrates supplemented with different oil sources. Differences among diets

in NDF degradation were not significant ($P = 0.132$), but the contrast comparing the control vs. oil-supplemented diets became significant ($P = 0.039$). This finding was unexpected, as only few studies have observed an effect similar to that seen in our study (e.g., Kim et al., 2008). It is noteworthy that none of the diets supplemented with an oil was significantly different from the control diet, and that whereas the contrast was significant for NDF, it was not so for acid detergent fiber. On the other hand, cellulolytic activity as determined with a highly sensitive method (gas production fermenting cellulose in the incubation medium from Rusitec fermenters), total VFA or acetate production and abundance of fibrolytic bacteria (*F. succinogenes* and *R. albus*) were not different among treatments, indicating that effects of oil supplementation on NDF digestibility would be rather subtle. Overall, considering all the data comprehensively it would be sound to assume that regardless the statistical significance for that particular contrast, the effect of oil supplementation on NDF degradation is of little biological relevance.

Copy numbers of *Succinivibrio* spp. as an example of the rumen Proteobacteria group was reduced. However, there were few exceptions with members of the bacteroidetes *Prevotella* spp. and *S. ruminantium* apparently benefitting from the addition of the oil and algae supplements. These nutritionally versatile groups may have been able to expand their niche as a result of the general reduction in numbers of other species.

Ciliate protozoa numbers were significantly increased with the addition of 1% FSH and ALG to the 2% SFL, and those of methanogens significantly reduced, particularly after ALG supplementation. The significant increase of ciliate protozoa in the present study was unexpected. Lipids have been reported as potential defaunating agents, albeit at much higher doses (Newbold and Chamberlain, 1988). Previous *in vivo* studies reported ciliate numbers were either unaffected (Boeckaert et al., 2008) or reduced (Boeckaert et al., 2007) following the addition of an algae supplement in the diet. However, the treatments excluded the addition of SFL and could merely highlight the differences between ciliate growth *in vivo* and *in vitro*. Martínez et al. (2010) reported protozoa numbers in RUSITEC fermenters were orders of magnitude reduced from and not representative of the protozoal population observed in rumen of sheep fed a similar diet.

A reduction of the number of methanogens caused by dietary oil supplementation was associated with the reduced rate of ruminal methane production by the RUSITEC fermenters. Methanogenesis has been reported to be correlated with methanogen numbers (Wallace et al., 2015). In our study, whereas the production of total fermentation gas was not affected by the inclusion of oils in the diet, the methane concentration in the gas was reduced by 16% on average compared with that observed with the CTR diet. As a result, methane production (expressed either as volume per day or as mmol/g fermented OM) was significantly reduced when FSH or ALG were added to the diet. Similar oil based dietary supplements have been found to reduce methane production *in vitro* (Castagnino et al., 2015). The link between dietary fat supplementation and a reduction in ruminal methane production has been also shown by compiling

data from different studies (Eugène et al., 2008). Another meta-analysis showed that fats added at low concentration to sheep diets may decrease methane production without affecting rumen fermentation (Patra, 2014), in agreement with our results in RUSITEC fermenters. Methane reduction by oil supplementation concurred with changes in the VFA profile, in particular with an increase in propionate production and a decreased acetate to propionate ratio. The relative increase in propionate production in response to the inclusion of dietary fats has been observed *in vitro* (Potu et al., 2011) and *in vivo* (Shingfield et al., 2012).

Ruminal biohydrogenation of PUFA has been well-documented (Jenkins et al., 2008). Linoleic acid is converted to CLA (C18:2 *c9t11*), which is then hydrogenated to vaccenic acid (C18:1 *t11*). Linolenic acid is converted to C18:3 *c9t11c15* and C18:2 *t11c15* as intermediates and finally hydrogenated to vaccenic acid. Under the highly reducing conditions prevailing in the rumen, vaccenic acid may be further saturated to stearic acid (C18:0). Less is known about the biohydrogenation of ω -3 PUFA having more than three double bonds (C20 or C22). It has been observed that these fatty acids disappear rapidly when incubated in cultures of mixed ruminal microorganisms (AbuGhazaleh and Jenkins, 2004), probably by isomerization, hydrogenation and chain shortening leading to the formation of *trans*-C18:1, although the intermediate steps have not been elucidated.

Anaerobic fungi have been found to play a role in the biohydrogenation of linoleic and linolenic acids (Nam and Garnsworthy, 2007). The addition of the different oil and algae supplements had a variable non-significant effect of the copy numbers of fungi relative to the control. Therefore, it is possible that other microorganisms had a more relevant contribution to biohydrogenation of fatty acids in our RUSITEC fermenters. The *Butyrivibrio* bacteria groups include species that are associated with the biohydrogenation of unsaturated fatty acids (Wallace et al., 2006). The toxicity of unsaturated acids on isolates of species within this group of bacteria has already been reported (Maia et al., 2010) as well as the reduction of copy number of *Butyrivibrio* spp. *in vivo* following the supplementation of vegetable oils (Kim et al., 2008) or algae (Boeckaert et al., 2008). It is apparent that there is considerable animal-to-animal variation in the response of rumen microbes to dietary oil (Belenguer et al., 2010). In the RUSITEC, oil or algae supplementation consistently reduced copy number of *Butyrivibrio* spp. relative to control, the stearic acid producing group (SA) being significantly affected by the SFL, FSH, and ALG treatments. In our study, total biohydrogenation of C18 fatty acids was reduced with the addition of fish oil or algae. The addition of dietary fish oil at 1% or 3% of dry matter intake has been found to affect adversely some bacterial species, in particular *Butyrivibrio* spp., and to reduce the biohydrogenation of fatty acids in the rumen (Kim et al., 2008). Stearic acid in the ruminal digesta was reduced in all the oil supplemented treatments, although the differences with the control diet did not reach statistical significance. Rumenic acid (C18:2 *c9t11*) was significantly increased in all oil supplemented treatments, probably in response to the sunflower oil, as no further increase was observed when fish oil or algae were added to this vegetable oil. The effects of oil supplementation on fatty acid profile and biohydrogenation in

ruminal digesta depend on the type and amount of oil added and on the diet to which the oil is incorporated (Shingfield et al., 2012). The addition of vegetable or marine oils at an appropriate dose could, in theory, contribute to the production of healthier products from ruminant livestock, provided this is not accompanied by an overall decrease in fat synthesis (Shingfield et al., 2006).

Copy numbers of *S. bovis* were reduced with the addition of the SFL, FSH, and ALG supplements, significantly in the latter. As a prominent lactate producer, *S. bovis* is associated with acidosis in livestock ruminants often as a response to the feeding of high concentrate diets (Petri et al., 2013). By reducing the proliferation of this microbial group with the addition of oils or algae to the diet it may be possible to remediate such a condition. However, the production of lactate was significantly increased with the addition of FSH or ALG to the diet possibly as a result of a proliferation of other lactate producing species such as the *Lactobacilli* not measured here. Despite the increase in lactate, it was not sufficient to significantly reduce the rumen pH. Moreover, the relative copy number of the corresponding lactate consumer *Megasphaera elsdenii* was not affected by the incorporation of oils to the diet. Studies with lambs (Ferreira et al., 2016) or dairy cows (Shingfield et al., 2003) reported a slight increase in rumen pH when feed was supplemented with fish oil. This effect was not observed in our *in vitro* study where the incubation medium in the fermenters is strongly buffered, so variations in pH may be not representative of those occurring *in vivo*. Lipid supplements increase the energy concentration of the diet without increasing the risk of rumen acidosis, but further research on the effects of adding oils to ruminant diets on lactate production and utilization is warranted.

Using the RUSITEC system it was demonstrated that there can be real potential to manipulate the rumen microbiota with the addition of vegetable and fish oils and marine algae supplements. The balance of the various groups of the microbial community can in turn contribute to a number of important aspects of livestock agriculture described previously. The effect on the microbial community of the supplementation was reflected in VFA and methane production activity with a significant shift toward propionate production and lower emissions. Moreover, there were concomitant changes in long chain fatty acid profiles and in biohydrogenation of unsaturated fatty acids without adversely affecting ruminal fermentation. Therefore, our findings support and add to the results of previous studies linking dietary fish oil supplements and the fatty acid composition in milk (Shingfield et al., 2006; Toral et al., 2012) and methane production (Eugène et al., 2008).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SL and SA conceived of and designed the experiments. JV and SL (Rusitec experiments, sampling), SA (TRFLP), LL (qPCR), and CG (DNA analysis) performed the experiments. SL, SA, JV, TS, and DY analyzed the data. The manuscript was written by TS,

SA, and SL, and all authors contributed to refining the text and approved the version to be submitted.

FUNDING

This work has been funded by Consejería de Educación, Junta de Castilla y León (research project LE007A07).

REFERENCES

- AbuGhazaleh, A. A., and Jenkins, T. C. (2004). Short communication: Docosahexaenoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. *J. Dairy Sci.* 87, 1047–1050. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73250-6
- Andrés, S., Bodas, R., Tejido, M. L., Giraldez, F. J., Valdés, C., and López, S. (2016). Effects of the inclusion of flaxseed and quercetin in the diet of fattening lambs on ruminal microbiota, *in vitro* fermentation and biohydrogenation of fatty acids. *J. Agric. Sci.* 154, 542–552. doi: 10.1017/S0021859615001094
- Bauman, D. E., Lock, A. L., Corl, B. A., Salter, A. M., and Parodi, P. W. (2005). “Milk fatty acids and human health: potential role of conjugated linoleic acid and trans fatty acids,” in *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress*, eds K. Sejrsen, T. Hvelplund, and M. O. Nielson (Wageningen: Wageningen Academic Publishers), 523–555.
- Belenguer, A., Toral, P. G., Frutos, P., and Hervás, G. (2010). Changes in the rumen bacterial community in response to sunflower oil and fish oil supplements in the diet of dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 93, 3275–3286. doi: 10.3168/jds.2010-3101
- Blanch, M., Calsamiglia, S., Di Lorenzo, N., Di Costanzo, A., Muetzel, S., and Wallace, R. J. (2009). Physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation in heifers. *J. Anim. Sci.* 87, 1722–1730. doi: 10.2527/jas.2008-1184
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giraldez, F. J., and López, S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176, 78–93. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010
- Boeckaert, C., Fievez, V., Van Hecke, D., Verstraete, W., and Boon, N. (2007). Changes in rumen biohydrogenation intermediates and ciliate protozoa diversity after algae supplementation to dairy cattle. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 767–777. doi: 10.1002/ejlt.200700052
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Fievez, V., Maignien, L., Dijkstra, J., and Boon, N. (2008). Accumulation of trans C_{18:1} fatty acids in the rumen after dietary algal supplementation is associated with changes in the *Butyrivibrio* community. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6923–6930. doi: 10.1128/aem.01473-08
- Carro, M. D., and Miller, E. L. (1999). Effect of supplementing a fiber basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semicontinuous culture system (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 82, 149–157. doi: 10.1017/S0007114599001300
- Castagnino, P. S., Messana, J. D., Fiorentini, G., De Jesus, R. B., Vito, E. S., Carvalho, I. P., et al. (2015). Glycerol combined with oils did not limit biohydrogenation of unsaturated fatty acid but reduced methane production *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 201, 14–24. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2014.12.004
- Cole, J. R., Chai, B., Marsh, T. L., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., et al. (2003). The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 31, 442–443. doi: 10.1093/nar/gkg039
- Cooper, S. L., Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G., Hallett, K. G., Enser, M., and Wood, J. D. (2004). Manipulation of the n-3 polyunsaturated fatty acid content of muscle and adipose tissue in lambs. *J. Anim. Sci.* 82, 1461–1470. doi: 10.2527/2004.8251461x
- Czerkawski, J. W., and Breckenridge, G. (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 38, 371–384. doi: 10.1079/BJN19770102
- Denman, S. E., and McSweeney, C. S. (2006). Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 572–582. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00190.x
- Denman, S. E., Tomkins, N. W., and McSweeney, C. S. (2007). Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 313–322. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00394.x
- Doreau, M., Arousseau, E., and Martin, C. (2009). Effects of linseed lipids fed as rolled seeds, extruded seeds or oil on organic matter and crude protein digestion in cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150, 187–196. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2008.09.004
- Eugène, M., Massé, D., Chiquette, J., and Benchaar, C. (2008). Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 88, 331–334. doi: 10.4141/CJAS07112
- Ferreira, E. M., Pires, A. V., Susin, L., Biehl, M. V., Gentil, R. S., Parente, M. D. M., et al. (2016). Nutrient digestibility and ruminal fatty acid metabolism in lambs supplemented with soybean oil partially replaced by fish oil blend. *Anim. Feed Sci. Technol.* 216, 30–39. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2015.09.007
- France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M. S., López, S., and Bannink, A. (2000). Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. *Br. J. Nutr.* 83, 143–150. doi: 10.1017/S0007114500000180
- Gao, J., Wang, M., Jing, Y., Sun, X., and Wu, T. (2016). Impacts of the unsaturation degree of long-chain fatty acids on the volatile fatty acid profiles of rumen microbial fermentation in goats *in vitro*. *J. Integr. Agric.* 15, 2827–2833. doi: 10.1016/s2095-3119(16)61418-1
- García-González, R., González, J. S., and López, S. (2010). Decrease of ruminal methane production in Rusitec fermenters through the addition of plant material from rhubarb (*Rheum* spp.) and alder buckthorn (*Frangula alnus*). *J. Dairy Sci.* 93, 3755–3763. doi: 10.3168/jds.2010-3107
- Hill, T. C. J., Walsh, K. A., Harris, J. A., and Moffett, B. F. (2003). Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 1–11. doi: 10.1111/j.1574-6941.2003.tb01040.x
- Hongoh, Y., Yuzawa, H., Ohkuma, M., and Kudo, T. (2003). Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 299–304. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00218-0
- Hristov, A. N., Oh, J., Lee, C., Meinen, R., Montes, F., Ott, T., et al. (2013). *Mitigation of Greenhouse Gas Emissions in Livestock Production – A Review of Technical Options for Non-CO₂ Emissions* (FAO Animal Production and Health Paper No. 177). Rome: FAO.
- Huws, S. A., Kim, E. J., Cameron, S. J. S., Girdwood, S. E., Davies, L., Tweed, J., et al. (2015). Characterization of the rumen lipidome and microbiome of steers fed a diet supplemented with flax and echium oil. *Microb. Biotechnol.* 8, 331–341. doi: 10.1111/1751-7915.12164
- Huws, S. A., Lee, M. R. F., Muetzel, S., Scott, M., Wallace, R. J., and Scollan, N. D. (2010). Forage type and fish oil cause shifts in rumen bacterial diversity. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 396–407. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00892.x
- IPCC (2007). *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, eds S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt et al. (New York, NY: Cambridge University Press).
- Jenkins, T. C. (1993). Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 76, 3851–3863. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(93)77727-9

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI). Support received from CICYT project AGL2005-04760-C02-02 is gratefully acknowledged.

- Jenkins, T. C., Wallace, R. J., Moate, P. J., and Mosley, E. E. (2008). Board-invited review: recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.* 86, 397–412. doi: 10.2527/jas.2007-0588
- Khafipour, E., Li, S., Plaizier, J. C., and Krause, D. O. (2009). Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7115–7124. doi: 10.1128/AEM.00739-09
- Kim, E. J., Huws, S. A., Lee, M. R. F., and Scollan, N. D. (2009). Dietary transformation of lipid in the rumen microbial ecosystem. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 22, 1341–1350. doi: 10.5713/ajas.2009.r.11
- Kim, E. J., Huws, S. A., Lee, M. R. F., Wood, J. D., Muetzel, S., and Scollan, N. D. (2008). Fish oil increases the duodenal flow of long chain polyunsaturated fatty acids and trans-11 18:1 and decreases 18:0 in steers via changes in the rumen bacterial community. *J. Nutr.* 138, 889–896.
- Korczyński, M., Witkowska, Z., Opaliński, S., Świniarska, M., and Dobrzański, Z. (2015). “Algae extract as a potential feed additive,” in *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications*, eds S.-K. Kim and K. Chojnacka (Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), 605–625.
- Kouřimská, L., Vondráčková, E., Fantová, M., Nový, P., Nohejlová, L., and Michnová, K. (2014). Effect of feeding with algae on fatty acid profile of goat's milk. *Sci. Agric. Bohem.* 45, 162–169. doi: 10.2478/sab-2014-0103
- Lemos, L. N., Fulthorpe, R. R., Triplett, E. W., and Roesch, L. F. W. (2011). Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *J. Microbiol. Methods* 86, 42–51. doi: 10.1016/j.mimet.2011.03.014
- Lourenço, M., Ramos-Morales, E., and Wallace, R. J. (2010). The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal* 4, 1008–1023. doi: 10.1017/S175173111000042X
- Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Kokeguchi, S., Petelin, M., et al. (2003). Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 39, 81–86. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00224-4
- Maia, M. R. G., Chaudhary, L. C., Bestwick, C. S., Richardson, A. J., McKain, N., Larson, T. R., et al. (2010). Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiol.* 10:52. doi: 10.1186/1471-2180-10-52
- Martínez, M. E., Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Saro, C., and Carro, M. D. (2010). Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. II. Protozoa population and diversity of bacterial communities. *J. Dairy Sci.* 93, 3699–3712. doi: 10.3168/jds.2009-2934
- McDougall, E. I. (1948). Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43, 99–109. doi: 10.1042/bj0430099
- Morán, L., Giraldez, F. J., Panseri, S., Aldai, N., Jordán, M. J., Chiesa, L. M., et al. (2013). Effect of dietary carnolic acid on the fatty acid profile and flavour stability of meat from fattening lambs. *Food Chem.* 138, 2407–2414. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.12.033
- Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., and Newbold, C. J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4, 1024–1036. doi: 10.1017/S1751731110000546
- Moya, D., Calsamiglia, S., Ferret, A., Blanch, M., Fandiño, J. I., Castillejos, L., et al. (2009). Effects of dietary changes and yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on rumen microbial fermentation of Holstein heifers. *J. Anim. Sci.* 87, 2874–2881. doi: 10.2527/jas.2008-1446
- Myer, P. R., Smith, T. P. L., Wells, J. E., Kuehn, L. A., and Freetly, H. C. (2015). Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. *PLoS ONE* 10:e0129174. doi: 10.1371/journal.pone.0129174
- Nagaraja, T. G., Newbold, C. J., van Nevel, C. J., and Demeyer, D. I. (1997). “Manipulation of ruminal fermentation,” in *The Rumen Microbial Ecosystem*, eds P. N. Hobson and C. S. Stewart (Dordrecht: Springer), 523–632.
- Nagaraja, T. G., and Titgemeyer, E. C. (2007). Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy. Sci.* 90, E17–E38. doi: 10.3168/jds.2006-478
- Nam, I. S., and Garnsworthy, P. C. (2007). Biohydrogenation pathways for linoleic and linolenic acids by *Orpinomyces* rumen fungus. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20, 1694–1698. doi: 10.5713/ajas.2007.1694
- Newbold, C. J., and Chamberlain, D. G. (1988). Lipids as rumen defaunating agents. *Proc. Nutr. Soc.* 47, 154A. doi: 10.1079/PNS19880062
- Ouwkerk, D., Klieve, A. V., and Forster, R. J. (2002). Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay. *J. Appl. Microbiol.* 92, 753–758. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01580.x
- Paillard, D., McKain, N., Rincon, M. T., Shingfield, K. J., Givens, D. I., and Wallace, R. J. (2007). Quantification of ruminal *Clostridium proteoclasticum* by real-time PCR using a molecular beacon approach. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1251–1261. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03349.x
- Palmquist, D. L., and Jenkins, T. C. (1980). Fat in lactation rations: review. *J. Dairy Sci.* 63, 1–14. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(80)82881-5
- Patra, A. K. (2014). A meta-analysis of the effect of dietary fat on enteric methane production, digestibility and rumen fermentation in sheep, and a comparison of these responses between cattle and sheep. *Livest. Sci.* 162, 97–103. doi: 10.1016/j.livsci.2014.01.007
- Petri, R. M., Schwaiger, T., Penner, G. B., Beauchemin, K. A., Forster, R. J., McKinnon, J. J., et al. (2013). Characterization of the core rumen microbiome in cattle during transition from forage to concentrate as well as during and after an acidotic challenge. *PLoS ONE* 8:e83424. doi: 10.1371/journal.pone.0083424
- Potu, R. B., AbuGhazaleh, A. A., Hastings, D., Jones, K., and Ibrahim, S. A. (2011). The effect of lipid supplements on ruminal bacteria in continuous culture fermenters varies with the fatty acid composition. *J. Microbiol.* 49, 216–223. doi: 10.1007/s12275-011-0365-1
- Shingfield, K. J., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., Arola, A., Nurmela, K. V. V., Huhtanen, P., et al. (2003). Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Anim. Sci.* 77, 165–179. doi: 10.1017/S1357729800053765
- Shingfield, K. J., Bonnet, M., and Scollan, N. D. (2013). Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. *Animal* 7, 132–162. doi: 10.1017/S1751731112001681
- Shingfield, K. J., Kairenius, P., Arölä, A., Paillard, D., Muetzel, S., Ahvenjärvi, S., et al. (2012). Dietary fish oil supplements modify ruminal biohydrogenation, alter the flow of fatty acids at the omasum, and induce changes in the ruminal *Butyrivibrio* population in lactating cows. *J. Nutr.* 142, 1437–1448. doi: 10.3945/jn.112.158576
- Shingfield, K. J., Reynolds, C. K., Hervás, G., Griinari, J. M., Grandison, A. S., and Beaver, D. E. (2006). Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 714–732. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72134-8
- Smith, P., Bustamante, M., Ahammad, H., Clark, H., Dong, H., Elsidig, E. A., et al. (2014). “Agriculture, Forestry and Other Land Use (AFOLU),” in *Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, eds O. Edenhofer, R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, K. Seyboth et al. (New York, NY: Cambridge University Press), 811–922.
- Stamey, J. A., Shepherd, D. M., de Veth, M. J., and Corl, B. A. (2012). Use of algae or algal oil rich in n-3 fatty acids as a feed supplement for dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 95, 5269–5275. doi: 10.3168/jds.2012-5412
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., and de Haan, C. (2006). *Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Stevenson, D. M., and Weimer, P. J. (2007). Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 165–174. doi: 10.1007/s00253-006-0802-y
- Sylvester, J. T., Karnati, S. K. R., Yu, Z. T., Morrison, M., and Firkins, J. L. (2004). Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. *J. Nutr.* 134, 3378–3384.
- Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., and Benno, Y. (2001). Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2766–2774. doi: 10.1128/AEM.67.6.2766-2774.2001
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., and France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185–197. doi: 10.1016/0377-8401(94)90171-6
- Toral, P. G., Belenguer, A., Shingfield, K. J., Hervás, G., Toivonen, V., and Frutos, P. (2012). Fatty acid composition and bacterial community changes in the rumen

- fluid of lactating sheep fed sunflower oil plus incremental levels of marine algae. *J. Dairy Sci.* 95, 794–806. doi: 10.3168/jds.2011-4561
- Varadyova, Z., Kisidayova, S., Siroka, P., and Jalc, D. (2008). Comparison of fatty acid composition of bacterial and protozoal fractions in rumen fluid of sheep fed diet supplemented with sunflower, rapeseed and linseed oils. *Anim. Feed Sci. Technol.* 144, 44–54. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.09.033
- Vargas-Bello-Pérez, E., Cancino-Padilla, N., Romero, J., and Garnsworthy, P. C. (2016). Quantitative analysis of ruminal bacterial populations involved in lipid metabolism in dairy cows fed different vegetable oils. *Animal* 10, 1821–1828. doi: 10.1017/S1751731116000756
- Wallace, R. J., Chaudhary, L. C., McKain, N., McEwan, N. R., Richardson, A. J., Vercoe, P. E., et al. (2006). *Clostridium proteoclasticum*: a ruminal bacterium that forms stearic acid from linoleic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 265, 195–201. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00487.x
- Wallace, R. J., Rooke, J. A., McKain, N., Duthie, C. A., Hyslop, J. J., Ross, D. W., et al. (2015). The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle. *BMC Genomics* 16:839. doi: 10.1186/s12864-015-2032-0
- Wang, Y., Ho, S. H., Cheng, C. L., Guo, W. Q., Nagarajan, D., Ren, N. Q., et al. (2016). Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 222, 485–497. doi: 10.1016/j.biortech.2016.09.106
- Wasowska, I., Maia, M. R. G., Niedźwiedzka, K. M., Czauderna, M., Ramalho Ribeiro, J. M. C., Devillard, E., et al. (2006). Influence of fish oil on ruminal biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids. *Br. J. Nutr.* 95, 1199–1211. doi: 10.1079/BJN20061783
- Weld, K. A., and Armentano, L. E. (2017). The effects of adding fat to diets of lactating dairy cows on total-tract neutral detergent fiber digestibility: a meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 100, 1766–1779. doi: 10.3168/jds.2016-11500
- Wu, Z., and Palmquist, D. L. (1991). Synthesis and biohydrogenation of fatty acids by ruminal microorganisms *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 74, 3035–3046. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78489-0

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Vargas, Andrés, Snelling, López-Ferreras, Yáñez-Ruiz, García-Estrada and López. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.