



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Facultad de Veterinaria

Departamento de Producción Animal

Fermentación ruminal: un análisis de las poblaciones microbianas y los parámetros fermentativos en sistemas *in vitro*

Ruminal fermentation: an analysis of microbial populations and fermentation parameters in in vitro systems

Iván Mateos Álvarez

León, 2016

Memoria presentada por Iván Mateos Álvarez y dirigida por las doctoras María Dolores Carro Travieso y María José Ranilla García para optar al grado de Doctor por la Universidad de León, dentro del programa de doctorado “Medicina, sanidad y producción animal y ciencia de los alimentos”.

León, 2016

Los trabajos que componen esta Tesis Doctoral han sido financiados por el CICYT (proyectos AGL2008-04707-C02-02 y AGL2011-22628 y acción integrada AIB2010NZ-00190) y el Ministerio de Economía y competitividad (proyecto AGL2011-22628).

Quisiera agradecer muy sinceramente a mis directoras, María José Ranilla y María Dolores Carro, por su excelente trabajo, su gran ayuda, su infinita paciencia y su enorme apoyo.

De la misma forma, me gustaría agradecer su ayuda a todas las personas e instituciones que han puesto a nuestra disposición los medios necesarios para la realización de esta Tesis Doctoral.

A mi familia

Y, sobre todo, a Cris que me ha ayudado muchísimo

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
ÍNDICE DE CONTENIDOS	III
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
LISTA DE ABREVIACIONES.....	XIII
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN, PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	1
CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 EL RUMEN Y SUS MICROORGANISMOS.....	9
2.2 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL	11
2.2.1 <i>Reseña histórica</i>	12
2.2 TIPOS DE SISTEMAS <i>IN VITRO</i>	16
2.2.1 <i>Cultivos no renovados de microorganismos ruminales (CNRMR)</i>	16
2.2.2 <i>Fermentadores</i>	22
2.2.2.1 <i>Sistemas de fermentación y flujo continuos (continuos culture fermenters, CCF)</i>	23
2.2.2.2 <i>Sistemas de fermentación continua y de flujo semi continuo</i>	25
2.3 FACTORES QUE AFECTAN A LA FERMENTACIÓN <i>IN VITRO</i>	27
2.3.1. <i>Relacionados con el inóculo del animal</i>	28
2.3.2. <i>Relacionados con la preparación del cultivo</i>	32
2.3.3. <i>Relacionados con el substrato incubado</i>	34
2.3.4. <i>Relacionados con el manejo de los sistemas in vitro y con el ambiente</i>	35
2.4 COMPARACIÓN <i>IN VIVO- IN VITRO</i>	42
2.4.1 <i>Comparación de parámetros fermentativos y de poblaciones microbianas</i>	42
2.5 TÉCNICAS MOLECULARES COMO HERRAMIENTA DE ESTUDIO	49
2.5.1 <i>Análisis automatizado de la región espaciadora intergénica ribosomal (Automated ribosomal intergenic spacer analysis, ARISA)</i>	52
2.5.2 <i>PCR cuantitativa (quantitative PCR, qPCR)</i>	53
2.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
3.1 ANIMALES EXPERIMENTALES.....	75
3.2 PRUEBAS <i>IN VITRO</i>	75
3.2.1 <i>Sistema de cultivos no renovados de microorganismos ruminales (CNRMR)</i> .	76

3.2.2 Sistema de fermentadores de flujo semicontinuo (RUSITEC)	77
3.3 PROCESADO DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS QUÍMICOS	80
3.3.1 Producción de gas y metano	80
3.3.2 Composición química.....	81
3.3.3 Amoníaco.....	81
3.3.4 Ácido láctico	81
3.3.5 Ácidos grasos volátiles.....	82
3.3.6 Actividad enzimática	82
3.3.7 Extracción y cuantificación de ADN	83
3.3.8 Análisis automatizado de la región espaciadora intergénica ribosomal (Automated Ribosomal Itergenic Spacer Analysis, ARISA)	83
3.3.9 PCR cuantitativa (quantitative PCR, qPCR).....	85
3.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
CAPÍTULO 4. PRUEBAS EXPERIMENTALES.....	89
4.1. PRUEBA 1. THE INFLUENCE OF DIET ON THE EFFECTIVENESS OF GARLIC OIL AND CINNAMALDEHYDE TO MANIPULATE <i>IN VITRO</i> RUMINAL FERMENTATION AND METHANE PRODUCTION.....	91
4.1.1 Abstract	95
4.1.2 Introduction.....	96
4.1.3 Materials and Methods.....	97
4.1.3.1 Animals and diets	97
4.1.3.2 Substrates, additives and in vitro fermentations.....	99
4.1.3.3 Analytical procedures	100
4.1.3.4 Calculations and statistical analyses	100
4.1.4 Results	101
4.1.4.1 Garlic oil effects	102
4.1.4.2 Cinnamaldehyde effects.....	106
4.1.5 Discussion	109
4.1.5.1 Garlic oil effects	109
4.1.5.2 Cinnamaldehyde effects.....	112
4.1.5.3 Diet effects.....	114
4.1.6 Conclusions	115
4.1.7 References	115
4.2. PRUEBA 2. COMPARISON OF FERMENTATION CHARACTERISTICS AND BACTERIAL DIVERSITY IN THE RUMEN OF SHEEP AND IN BATCH CULTURES OF RUMEN MICROORGANISM	121

4.2.1	<i>Abstract</i>	125
4.2.2	<i>Introduction</i>	126
4.2.3	<i>Materials and methods</i>	127
4.2.3.1	Animals, diets and experimental design	127
4.2.3.2	DNA extraction and automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA)	131
4.2.3.3	Calculations and statistical analyses	133
4.2.4	<i>Results</i>	133
4.2.5	<i>Discussion</i>	142
4.2.6	<i>References</i>	146
4.3	PRUEBA 3. INFLUENCE OF RUMEN CONTENTS' PROCESSING METHOD ON MICROBIAL POPULATIONS IN THE FLUID AND SUBSEQUENT <i>IN VITRO</i> FERMENTATION OF SUBSTRATES OF VARIABLE COMPOSITION	149
4.3.1	<i>Abstract</i>	153
4.3.2	<i>Introduction</i>	154
4.3.3	<i>Material and methods</i>	155
4.3.3.1	Donor animals and feeding	155
4.3.3.2	Processing methods of ruminal digesta	156
4.3.3.3	Substrates and <i>in vitro</i> incubations	157
4.3.3.4	Analytical procedures	159
4.3.3.5	DNA extraction, qPCR and automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA)	159
4.3.3.6	Calculations and statistical analyses	161
4.3.4	<i>Results</i>	161
4.3.4.1	Effects of processing methods on microbial populations in the ruminal fluid	162
4.3.4.2	Effects of processing methods on fermentation parameters	166
4.3.5	<i>Discussion</i>	172
4.3.6	<i>Conclusion</i>	178
4.3.7	<i>References</i>	179
4.4	PRUEBA 4. SHIFTS IN MICROBIAL POPULATIONS DEVELOPED IN RUSITEC FERMENTERS OVER THE INCUBATION PERIOD DIFFER BETWEEN SOLID AND LIQUID DIGESTA PHASES AND ARE INFLUENCED BY DIET	185
4.4.1	<i>Introduction</i>	190
4.4.2	<i>Materials and methods</i>	191
4.4.2.1	Animals and diets	191
4.4.2.2	<i>Rusitec incubations, sampling and chemical analyses</i>	193

4.4.2.3 Extraction of DNA, qPCR and Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA)	195
4.4.2.4 Calculations and statistical analyses	197
4.4.4 <i>Results</i>	198
4.4.4.1 Microbial populations and bacterial diversity.....	198
4.4.4.2 Fermentation parameters and relationships with microbial populations	200
4.4.4.3 Daily microbial growth	201
4.4.5 <i>Discussion</i>	202
4.4.6 <i>Conclusions</i>	209
4.4.7 <i>References</i>	210
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN GENERAL	225
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	261
CAPÍTULO 7. RESUMEN / SUMMARY	269

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Trabajos que comparan la fermentación ruminal <i>in vitro</i> vs. <i>in vivo</i>	45
Tabla 3.1 Secuencias de los cebadores para el análisis automatizado de la región espaciadora intergénica ribosomal.....	84
Tabla 3.2 Secuencia de los cebadores para la PCR en tiempo real.....	86
Tabla 4.1.1 Ingredient composition and chemical analysis of medium- (MC) and high-concentrate (HC) diets fed to donor sheep and used as substrates for the <i>in vitro</i> fermentations	98
Tabla 4.1.2 Mean values of pH and concentrations of volatile fatty acids (VFA), NH ₃ -N and total lactate in ruminal fluid used as inoculum for the <i>in vitro</i> incubations	103
Tabla 4.1.3 Effects of five doses of garlic oil (0, 20, 60, 180 and 540 mg/L for CON, GO20, GO60, GO180 and GO540, respectively), on total volatile fatty acid production (VFA), molar proportions of VFA, acetate : propionate ratio, and apparently fermented organic matter (AFOM) after <i>in vitro</i> fermentation of diets (300 mg) with medium-concentrate (MC) and high-concentrate (HC) content by mixed rumen microorganisms for 16 h (n = 4)	104
Tabla 4.1.4 Effects of five doses of garlic oil (0, 20, 60, 180 and 540 mg/L for CON, GO20, GO60, GO180 and GO540, respectively), on final pH, concentrations of NH ₃ -N and total lactate, production of gas and methane, methane/volatile fatty acid ratio (methane/VFA), proportion of methane in the gas produced and hydrogen recovery after <i>in vitro</i> fermentation of diets (300 mg) with a medium- (MC) and high- (HC) concentrate content by mixed rumen microorganisms for 16 h (n = 4).....	105
Tabla 4.1.5 Effects of five doses of cinnamaldehyde (0, 20, 60, 180 and 540 mg/L for CON, CIN20, CIN60, CIN180 and CIN540, respectively), on total volatile fatty acid production (VFA), molar proportions of VFA, acetate : propionate ratio, and apparently fermented organic matter (AFOM)	

after *in vitro* fermentation of diets (300 mg) with a medium- (MC) and high- (HC) concentrate content by mixed rumen microorganisms for 16 h (n = 4).....107

Table 4.1.6 Effects of five doses of cinnamaldehyde (0, 20, 60, 180 and 540 mg/L for CON, CIN20, CIN60, CIN180 and CIN540, respectively), on final pH, concentrations of NH₃-N and total lactate, production of gas and methane, methane/volatile fatty acid ratio (methane/VFA), proportion of methane in the gas produced and hydrogen recovery after *in vitro* fermentation of diets (300 mg) with a medium- (MC) and high- (HC) concentrate content by mixed rumen microorganisms for 16 h (n = 4).....108

Table 4.2.1 Ingredient (g/kg dry matter) and chemical composition (g/kg dry matter) of the experimental diets with 700 g of forage/kg dry matter (HF) or 300 g of forage/kg dry matter (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage130

Table 4.2.2 Effect of forage:concentrate ratio (FCR) and type of forage on apparent degradability(g/g) of dry matter and neutral-detergent fibre, concentrations of NH₃-N (mg/l), lactate (mg/l) and total volatile fatty acids (mmol/l), molar proportions (mol/100 mol) of individual volatile fatty acids and acetate/propionate ratio (mol/mol) in sheep and in batch cultures of rumen microorganisms (BC) inoculated with sheep ruminal fluid135

Table 4.2.3 Effect of forage:concentrate ratio (FCR) and type of forage on values of Shannon index and numbers of peaks detected in the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) electropherograms of samples from batch cultures of rumen microorganisms (BC) and from the sheep rumen fluid (IN) used to inoculate the BC, and similarity index (%) of ARISA profiles between BC and IN139

Table 4.3.1 Chemical composition (g/kg dry matter) of the substrates used in the *in vitro* incubations157

Table 4.3.2 Influence of processing methods of ruminal digesta from sheep on total bacterial and protozoal DNA concentrations, the relative abundance of

<i>Ruminococcus flavefaciens</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Fibrobacter succinogenes</i> , fungal and methanogenic archaeal DNA in the fluid, and values of Shannon index and numbers of peaks detected in the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) electropherograms	163
Tabla 4.3.3 Influence of processing methods to obtain rumen fluid (PM) on the fermentation parameters of substrates differing in their forage (FOR) and forage:concentrate ratio (FC) incubated <i>in vitro</i> for 8 h ¹	167
Tabla 4.3.4 Influence of processing methods to obtain rumen fluid (PM) on the fermentation parameters of substrates differing in their forage (FOR) and forage:concentrate ratio (FC) incubated <i>in vitro</i> for 24 h ¹	169
Tabla 4.4.1 Evolution through the incubation period of total bacterial DNA, total protozoal DNA, and the relative abundance of <i>Ruminococcus flavefaciens</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Fibrobacter succinogenes</i> , methanogenic archaea and fungal DNA in solid and liquid contents of Rusitec fermenters fed diets with medium (MC) and high (HC) concentrate content (n = 4)	216
Tabla 4.4.2 Evolution through the incubation period of Shannon index and numbers of peaks detected in the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) electropherograms in solid and liquid contents of Rusitec fermenters fed diets with medium (MC) and high (HC) concentrate content, and similarity index of ARISA profiles between solid and liquid contents.....	217
Tabla 4.4.3 Evolution through the incubation period of fermentation parameters and enzymatic activity in Rusitec fermenters fed diets with medium (MC) and high (HC) concentrate content (n = 4)	218
Tabla 4.4.4 Daily microbial growth in the solid and liquid phases of Rusitec fermenters fed diets with medium (MC) and high (HC) concentrate content as determined using ¹⁵ N as a microbial marker or from bacterial and protozoal DNA concentrations	220
Tabla 5.1 Matriz de correlación (valores del coeficiente de Pearson y valores de P entre paréntesis) de las abundancias de los microorganismos (ADN	

bacteriano (Bac), ADN protozooario (Prt), abundancia relativa de hongos (Hong), arqueas (Arq), Fibrobacter succinogenes (Fs), Ruminococcus flavefaciens (Rf), Ruminococcus albus (Ra)) con los parámetros de fermentación (concentración de amoníaco (Am), pH, AGV totales (AGV), producción de metano (Met) y relación acético:propiónico (Ac:Pr)) en cultivos no renovados de microorganismos ruminales con tres forrajes diferentes (alfalfa (A), gramíneas (G) y paja de cebada (S)) y con diferente cantidad de forraje y concentrado (solo forraje (F) o 50:50 forraje:concentrado (FC))243

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 3.1 Cultivos no renovados de microorganismos ruminales.....76

Figura 3.2 Sistema de 8 fermentadores de flujo semicontinuo.....78

Figura 4.2.1 Dendrograms of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) profiles of bacterial communities in ruminal fluid from sheep used as inoculum (IN) and in batch cultures (BC) after 24 h of incubation for diets with either 700 (HC) or 300 (HF) of concentrate per kg DM and alfalfa hay (Fig. 1A) or grass hay (Fig. 1B) as forage. Numbers 1 to 4 correspond to individual sheep. In each case, sheep were fed the same diet incubated in the BC141

Figura 4.3.1 Dendrogram of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) profiles of bacterial communities in ruminal fluid from sheep obtained by squeezing ruminal contents through four layers of cheesecloth (SQ), further filtration of squeezed fluid through a 100 μm nylon cloth (FL), and treatment with Stomacher[®] for 3 min at 230 rpm before squeezing through four layers of cheesecloth (STO). Numbers 1 to 4 correspond to individual sheep164

Figura 4.3.2 Venn diagrams showing the shared and unique peaks in the ARISA electropherograms of ruminal fluid samples obtained by the three treatments (SQ, FL and STO; Figure 2A) and of ruminal fluid samples from each of the four sheep used as donors (S1 to S4; Figure 2B).....165

Figura 4.3.3 Canonical correspondence analysis (CCA) plot of microbial populations in the inoculum and fermentation parameters in 8 h-incubations of forages (A: alfalfa hay; G: grass hay; S: barley straw; Figure 3A) or substrates with different forage:concentrate ratio (F: 100% forage; FC: 50:50 forage:concentrate; Figure 3B), with arrows indicating increasing values of fermentation parameters. Each label corresponds to an individual inoculum obtained by squeezing ruminal contents through four layers of cheesecloth (SQ), filtration of squeezed fluid through a 100 μm nylon cloth (FL) or treatment with Stomacher (STO), and numbers 1 to 4 correspond to individual sheep. Circles were drawn for helping in samples identification. AcPr: acetate:propionate ratio; Am: Ammonia-N; Met: CH₄; VFA: total VFA; Bac: Total bacteria; Prt: total protozoa; Arq: methanogenic archaea; Fs: *Fibrobacter succinogenes*; Rf: *Ruminococcus flavefaciens*; Ra: *Ruminococcus albus*.....171

Figura 4.4.1 Principle coordinates analysis plot of Bray–Curtis dissimilarities in the ARISA profiles of DNA samples from liquid (L) and solid (S) phases from Rusitec fermenters fed medium-concentrate (triangles) or high-concentrate (squares) diets. Points are colored according sampling time on day 0 (inocula, green), 3 (pink), 8 (yellow) and 14 (blue) after inoculation. Numbers 1-4 correspond to individual fermenters. Samples IN and INR are ruminal inocula in the incubation run 1 and 2, respectively221

Figura 4.4.2 Dendrograms of ARISA profiles of bacterial communities in solid (S) and liquid (L) ruminal content from sheep used as inoculum (IN and INR) and in Rusitec fermenters (F) for medium- (2A) and high-concentrate diets (2B). Numbers 1 to 4 correspond to individual fermenters. In each case, donor sheep were fed the same diet incubated in the fermenters.....222

Figura 4.4.3 Principal component analysis plot of microbial populations and fermentation parameters, with arrows indicating increasing values. Samples from solid (Figure A) and liquid (Figure B) phases from Rusitec fermenters fed medium-concentrate (triangles) or high-concentrate (squares) diets. Points are colored according sampling time on day 3 (pink), 8 (yellow) and 14 (blue) after inoculation. Each symbol corresponds to a fermenter sample. Capr.: caproate; FS: *Fibrobacter succinogenes*; RF: *Ruminococcus flavefaciens*; RA: *Ruminococcus albus*223

LISTA DE ABREVIACIONES

A/AL	dieta cuyo forraje es heno de alfalfa
ADN/DNA	ácido desoxirribonucleico
AFOM/MOAF	materia orgánica aparentemente fermentable
AGV/VFA	ácidos grasos volátiles
ARISA	automated ribosomal intergenic spacer analysis
ARN	ácido ribonucleico
°C	grado centígrado
CCF	fermentadores de flujo continuo
CIN	cinamaldehído
CON	control
cm	centímetro
CNRMR/BC	cultivos no renovados de microorganismos ruminales
Cq	ciclo de cuantificación
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FCR/FC	relación forraje:concentrado
FAD/ADF	fibra ácido detergente
FND/NDF	fibra neutro detergente
FOR	forraje
g	gramo
g	fuerza de la gravedad
G/GR	dieta cuyo forraje es heno de gramíneas
GO/AA	aceite de ajo
h	hora

HF/AF	dieta cuya relación forraje:concentrado es 70:30
HC/AC	dieta cuya relación forraje:concentrado es 30:70
L	litro
LAB	bacterias asociadas a la fase líquida
LIQ	fase líquida de los fermentadores
M	molar
MC	dieta cuya relación forraje:concentrado es 50:50
min	minuto
μL	microlitro
mL	mililitro
μm	micrómetro
μM	micromolar
mm	milímetro
mM	milimolar
MO	materia orgánica
MS/DM	materia seca
ng	nanogramo
nm	nanómetro
NNP	nitrógeno no proteico
PC/BS/S	dieta cuyo forraje es paja de cebada
PCA	principal component analysis
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PCoA	principal coordinates analysis
PM/MP	método de procesado
psi	pound per square inch
qPCR	PCR cuantitativa
rpm	revoluciones por minuto

SAB	bacterias asociadas a la fase sólida
SOL	fase líquida de los fermentadores
Sto/STO	tratamiento del contenido ruminal con Stomacher®
SQ	filtrado del contenido ruminal a través de cuatro capas de gasa
T-RFLP	terminal restriction fragment length polymorphism
UI	unidades internacionales
UPGMA	unweight pair-group method algorithm
vol:vol/v:v	volumen:volumen

Capítulo 1. Introducción, planteamiento del problema y objetivos

El rumen es un ecosistema microbiano anaerobio que está habitado por una población microbiana compleja, incluyendo bacterias, protozoos, hongos, y arqueas metanogénicas. La complejidad del ecosistema ruminal, las dificultades de trabajar con animales fistulados y la mayor conciencia pública sobre los derechos de los animales han contribuido al desarrollo de numerosas técnicas para simular la fermentación ruminal *in vitro*. Estos sistemas encajan perfectamente en el objetivo del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (BOE de 8 de febrero de 2013), que regula la utilización de animales en experimentación. La legislación vigente fomenta la puesta a punto de métodos alternativos que puedan aportar el mismo nivel de información que el obtenido en procedimientos con animales y que supongan una menor utilización de estos, conceptos que actualmente se engloban en el «principio de las tres erres» (reducción, refinamiento y reemplazo). Los sistemas *in vitro* son ampliamente utilizados para la evaluación de la calidad nutricional de los alimentos y las dietas, pero también se utilizan frecuentemente para valorar los efectos de diferentes tipos de aditivos (extractos de plantas, enzimas...) sobre la fermentación ruminal y, más recientemente, para analizar diferentes estrategias para mitigar la emisión de metano por parte de los rumiantes. Además, las pruebas *in vitro* son una herramienta útil para la realización del cribado de aditivos y dosis para su posterior evaluación *in vivo*. En la literatura, se han descrito muchos tipos de sistemas artificiales de simulación de la fermentación que ocurre en el rumen, como los cultivos no renovados de microorganismos ruminales, los fermentadores de flujo continuo y los fermentadores de flujo semicontinuo, como el RUSITEC. El mejor conocimiento de los procesos que acontecen en el rumen y la mejora de los sistemas de simulación de la fermentación ruminal *in vitro*, van a permitir una reproducción más fidedigna de los procesos biológicos que suceden en el interior del rumen.

La identificación de sustancias que modifican la fermentación ruminal para aumentar su eficiencia y disminuir la cantidad de metano y compuestos nitrogenados excretados en el medio ambiente es un objetivo importante de la investigación actual en la nutrición de rumiantes. En los últimos años, el potencial de una amplia gama de extractos de plantas como aditivos para manipular la fermentación ruminal ha sido ampliamente investigado mediante sistemas *in vitro*. Sin embargo, es difícil evaluar cómo un sistema *in vitro* puede reproducir lo que acontece en el rumen *in vivo* y seleccionar los parámetros correctos para llevar a cabo la comparación. Cualquier sistema *in vitro* diseñado para simular la fermentación ruminal debe imitar el rumen, incluyendo el medio físico y el mantenimiento de las poblaciones microbianas clave. De manera ideal, la composición microbiana en el sistema *in vitro* debe ser representativa, en términos de cantidad y calidad, de la que se encuentra en el rumen del animal hospedador.

Los resultados de estudios de la fermentación ruminal *in vitro* están influenciados por varios factores, siendo de los más importantes la fuente y la actividad del inóculo microbiano, y por lo tanto el tipo de poblaciones microbianas presentes en el líquido ruminal utilizado como inóculo. Es por ello que la aplicación de técnicas moleculares al análisis del líquido de fermentación de cultivos en sistemas *in vitro* representa una posible mejora en el estudio y desarrollo de los diferentes sistemas de incubación *in vitro*. Algunas técnicas moleculares permiten la cuantificación directa de diferentes cepas microbianas en el inóculo ruminal y en el líquido de fermentación *in vitro*, como por ejemplo la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) y otras permiten analizar la diversidad de las poblaciones (ARISA, DGGE, TRFLP...). A pesar de la importancia de este aspecto, son relativamente pocos los estudios realizados sobre el mismo (Soto *et al.*, 2013)

La utilización de fermentadores ruminales para el estudio de la fermentación ruminal *in vitro* permite mantener las incubaciones durante períodos de varios días o incluso semanas y, por tanto, se producen cambios cuantitativos y cualitativos en las poblaciones microbianas durante el período de incubación. Las poblaciones microbianas y su abundancia relativa también varían con los cambios en la composición de los alimentos y las condiciones de manejo de los fermentadores, que pueden tener una influencia variable en los microorganismos desarrollados cuando se incuban diferentes dietas. Algunos estudios han abordado estos aspectos en fermentadores de flujo continuo (Muetzel *et al.*, 2009; Soto *et al.*, 2012), pero no existe información relativa a las poblaciones microbianas que se desarrollan en fermentadores de flujo semicontinuo (RUSITEC).

Con estos antecedentes, en esta Tesis Doctoral, se pretende analizar diferentes factores que afectan a la fermentación ruminal *in vitro* y a los microorganismos ruminales que se desarrollan en cultivos no renovados de microorganismos ruminales y en fermentadores RUSITEC. Para lograr este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

1) Evaluar la influencia del tipo de dieta administrada a los animales donantes de líquido ruminal e incubada en cultivos no renovados de microorganismos ruminales sobre los efectos de dosis crecientes de aceite de ajo y cinamaldehído en la fermentación ruminal *in vitro*.

2) Evaluar cómo los cultivos no renovados de microorganismos ruminales pueden reproducir la fermentación ruminal *in vivo* de dietas de composición variable y analizar los cambios producidos en las comunidades bacterianas durante el período incubación determinados mediante el análisis automático del espacio intergénico ribosomal (ARISA).

3) Evaluar el efecto del procesado del contenido ruminal en las poblaciones microbianas (bacterias, protozoos, hongos y arqueas metanogénicas) y la

Capítulo 1

diversidad bacteriana en el líquido obtenido y sobre los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* usando este fluido como inóculo.

4) Evaluar la evolución de las poblaciones microbianas (bacterias, protozoos, hongos y arqueas metanogénicas) y de las características de la fermentación durante el periodo de incubación en fermentadores RUSITEC que recibían dos dietas diferentes.

Capítulo 2. Revisión bibliográfica

2.1 El rumen y sus microorganismos

Los animales rumiantes poseen la capacidad de transformar alimentos vegetales indigestibles para los humanos en alimentos de elevado valor nutritivo para nuestra especie. Esta característica está asociada fundamentalmente a las diferencias anatómicas y funcionales del aparato digestivo de los rumiantes con respecto a otros grupos animales. En los rumiantes el estómago se encuentra dividido en cuatro compartimentos diferenciados anatómicamente y funcionalmente. El rumen es el mayor de los preestómagos y su interior se encuentra dividido en compartimentos denominados sacos, separados entre sí mediante pilares musculares, formando junto al retículo una cámara de fermentación (Van Soest, 1994). El omaso es la siguiente cavidad y su mucosa presenta papilas en forma de hoja que absorben agua y minerales y cuya principal función es evitar el paso de partículas de gran tamaño del retículo al abomaso (Van Soest, 1994). Por último, el abomaso presenta una mucosa de tipo glandular y secreta mucus, pepsinógeno y ácido clorhídrico, de forma similar al estómago de los animales monogástricos (Van Soest, 1994). En el tracto gastrointestinal de los rumiantes se establece un complejo ecosistema microbiano capaz de degradar los hidratos de carbono estructurales presentes en los vegetales que ingiere el animal (Cheng *et al.*, 1991). Así, los rumiantes utilizan como nutrientes los productos finales de la fermentación, por parte de los microorganismos, del alimento ingerido, y los nutrientes que forman parte de dichos microorganismos cuando estos pasan a tramos posteriores del tracto gastrointestinal (abomaso e intestino delgado) (Asplund, 1994).

El contenido ruminal se encuentra estratificado en función de la densidad de sus componentes (Cheng y McAllister, 1997). En la parte superior se acumulan los gases producidos durante la fermentación. El material sólido o semisólido se sitúa en la parte central del rumen formando una matriz y en la parte inferior se encuentra el líquido, junto con las partículas más pequeñas de alimento en

Capítulo 2

suspensión. El contenido ruminal se mezcla gracias a contracciones (Van Soest, 1994) que hacen que el líquido ruminal circule a través del sólido, arrastrando partículas solubles y microorganismos hacia tramos posteriores del tracto gastrointestinal. Además, existen contracciones secundarias que favorecen los procesos de rumia y eructación. La rumia es la regurgitación de parte del contenido ruminal hacia la boca, donde se vuelve a masticar e insalivar antes de ser deglutido (Van Soest, 1994). Es un proceso cíclico y al tiempo dedicado a rumiar es directamente proporcional a la cantidad de fibra ingerida. La eructación permite a los rumiantes eliminar el gas producido en el rumen durante los procesos fermentativos, principalmente dióxido de carbono y metano. La actividad del rumen está regulada por el sistema nervioso parasimpático y responde al estímulo de diversos receptores. Los mecanorreceptores bucales se estimulan cuando el animal está masticando, tanto durante la alimentación como durante la rumia y provocan, de forma refleja, un aumento de la frecuencia de las contracciones ruminales. Existen además receptores de presión que miden el grado de distensión de la capa muscular del rumen, abomaso e intestino y que favorecen la motilidad cuando detectan distensión en las paredes ruminales. Los alimentos forrajeros, más voluminosos, favorecen la motilidad ruminal y los procesos fermentativos más que los alimentos concentrados, al distenderse más las paredes ruminales. También existen en el rumen receptores de tipo químico que detectan cambios en el pH, la concentración de ácidos grasos volátiles y la osmolaridad.

El rumen es un ecosistema anaerobio microbiano habitado por una compleja población de microorganismos como bacterias, hongos, protozoos y arqueas que viven en simbiosis con el animal hospedador. El rumen proporciona a los microorganismos un ambiente idóneo para su desarrollo.

Este ecosistema ruminal está compuesto por bacterias (con una concentración media de 10¹¹ bacterias/mL), arqueas metanogénicas (10⁹ arqueas/mL),

protozoos (más de 20 especies, con cifras de 106 protozoos/mL), hongos (con densidades que alcanzan las 106 zoosporas/mL) y bacteriófagos (1010 virus/mL) (Morgavi *et al.*, 2013). El ecosistema ruminal se encuentra en constante cambio; los diferentes individuos están interrelacionados entre sí y con el medio y al poseer diferentes estrategias de utilización de los recursos es posible mantener la diversidad de las comunidades (Czerkawski, 1986). Existe un considerable grado de interdependencia entre las diferentes especies, utilizando unas los productos de desecho del metabolismo de otras. Las interacciones entre los microorganismos ruminales contribuyen a la estabilidad y adaptabilidad del ecosistema ruminal y juegan un papel importante en la adaptación a diferentes alimentos, cambios en las raciones u otros factores. Pero estas interacciones son difíciles de estudiar (Doré y Gouet, 1991). Existe competencia entre las especies por los sustratos y el éxito de cada una dependerá del ritmo de transporte de los mismos al interior de la célula y su ritmo de fermentación.

Los microorganismos ruminales crecen y se desarrollan cuando las condiciones ambientales son adecuadas. En el rumen existe un flujo constante de contenido hacia el abomaso y, por tanto, el ritmo de división celular de los microorganismos debería, teóricamente, ser mayor que ese ritmo de paso para asegurar su supervivencia. Sin embargo, en la práctica, el rumen permite numerosos ritmos de crecimiento ya que muchos de los microorganismos se encuentran adheridos a las partículas de alimento jugando un papel muy importante en la degradación de los alimentos fibrosos.

2.2 Estudios *in vitro* de la fermentación ruminal

El rumen y todo lo que en él acontece ha supuesto, para los investigadores, un importante desafío científico (Czerkawski, 1986). Es un sistema fluctuante, en el cual ocurren de forma simultánea procesos de fermentación, secreción y absorción de productos y flujos en diferentes direcciones y a diferentes velocidades, y como ecosistema acoge una constante relación de acción-reacción

entre los factores bióticos (los microorganismos ruminales) y abióticos (como la temperatura, el pH, etc.) y a su vez con el animal hospedador. Aunque se tenga acceso a su interior por medios quirúrgicos, el estudio de estos procesos *in vivo* resulta complejo por la dificultad para el control de todos los factores implicados (Bryant y Robinson, 1968).

Es por ello que, en el interés por conocer el medio ruminal y lo que allí sucede, se comenzó a tratar de simular *in vitro* la fermentación ruminal dando paso al desarrollo de diferentes sistemas.

2.2.1 Reseña histórica

Durante muchos años se hicieron intentos de aislar pequeñas fracciones del contenido del rumen y que esas fracciones continuaran fermentando bajo condiciones controladas en el laboratorio (Czerkawski, 1986). Los intentos por construir un rumen artificial han sido numerosos, (Johnson, 1963). A finales del siglo XIX, entre 1874 y 1882, varios autores llegaron de forma independiente a la conclusión de que los microorganismos eran responsables de la desaparición de la celulosa en el tracto gastrointestinal de los rumiantes (Marston, 1948). Entre 1882 y 1888, Tappeiner realizó los primeros intentos de simulación de la fermentación *in vitro* (Marston, 1948), incubando líquido ruminal junto con pulpa de celulosa y algodón y viendo cómo estos materiales desaparecían concluyendo que se producía una degradación de la celulosa, asociada además a la producción de AGV, CO₂ y CH₄. En 1891, Zuntz postuló que el nitrógeno no proteico (NNP) era convertido en proteína por los microorganismos del rumen, y que por tanto estos contribuirían a suplir los requerimientos proteicos del animal, aunque apenas existía aún un conocimiento del ecosistema ruminal. En 1922 Henneberg (citado por Baker y Harriss, 1947) utilizó por primera vez el microscopio para observar la comunidad bacteriana relacionada con la degradación de la celulosa, y posteriormente autores como Hungate en 1950 comenzaron a aislar algunas especies para profundizar en su estudio.

En 1938, Woodman y Evans estudiaron la digestión de la celulosa y concluyeron que la glucosa sólo era un intermediario en la digestión en el rumen, siendo los productos finales de la digestión los AGV y otros ácidos como el láctico y el pirúvico. En 1943, Quin utilizó frascos cerrados herméticamente y midió el gas producido durante la fermentación con un manómetro, concluyendo que había una relación directa entre la digestión ruminal y la actividad bacteriana, y que por tanto la nutrición de los rumiantes estaba ligada a los productos que se derivan del metabolismo microbiano.

Pearson y Smith (1943) diseñaron un sistema que consistía en un tubo de ensayo provisto de cierre con una válvula para la salida de los gases de fermentación. Estos autores añadieron urea y sales a su medio de cultivo ratificando la utilización de la urea para la formación de proteína microbiana y su hidrólisis hasta NH_3 , hecho que había sido demostrado previamente por Wegner *et al.* (1940). Más tarde se incorporó el borboteo de gas y la agitación del sistema, y posteriormente la conexión de un sistema de recogida intermitente del gas producido en la fermentación (Czerkawski y Breckenridge, 1969b). La cantidad de información que proporcionaba este sistema era limitada, pero con diferentes variaciones en su construcción, como la adición de sales (sulfatos y fosfatos) y minerales traza, fue empleado para evaluar la fermentación *in vitro* de la celulosa por parte de los microorganismos ruminales (Marston 1948) y para el estudio de la actividad de los microorganismos de rumen de bovino y su relación con el timpanismo ruminal (Hungate *et al.*, 1955).

En 1948, McDougall publicó la composición de una solución amortiguadora que podía utilizarse como sustituto de la saliva de los rumiantes, hecho que fue de vital importancia para el desarrollo de las técnicas *in vitro* (Johnson, 1963).

En 1956, Warner estableció tres criterios necesarios para que un sistema *in vitro* fuera válido a la hora de representar las condiciones *in vivo*:

Capítulo 2

1) que mantuviera las cantidades, apariencia y proporciones de las bacterias, y protozoos

2) que mantuviera unas tasas normales de degradación de la celulosa, el almidón y las proteínas

3) que fuera capaz de predecir de forma cuantitativa los resultados obtenidos *in vivo*.

A partir de ese momento, numerosos autores han tratado de diseñar sistemas que cumplieran estos requerimientos, con mayor o menor éxito dependiendo de los trabajos (Warner 1956, Adler *et al.*, 1958; Davey *et al.*, 1960; Bowie, 1962; Gray *et al.*, 1962; Harbers y Tillman, 1962). Gray *et al.* (1962) diseñaron un rumen artificial complejo, con el cual encontraron que la formación de AGV a partir de un sustrato dado era similar a lo que ocurría en el rumen de los animales que recibían la misma dieta. En 1963, Johnson sugería algunos campos de la investigación en los que las técnicas *in vitro* podían ser herramientas de gran valor:

1) Digestión de la celulosa y factores que la afectan

2) Utilización del nitrógeno no proteico

3) Metabolismo intermediario en cultivos puros y mixtos

4) Estudios de simbiosis entre microorganismos ruminales

5) Técnicas de valoración de sustancias con posibles efectos positivos sobre la fermentación ruminal, para realizar cribados y escoger la dosis óptima

6) Evaluación de la digestión de los forrajes

En 1964, Slyter *et al.*, desarrollaron uno de los primeros sistemas que permitían el cultivo de microorganismos ruminales *in vitro* mantenido en el

tiempo (durante unas semanas en este caso) pudiendo investigar cómo evolucionaban las comunidades microbianas con el paso de los días, mediante el conteo de protozoos en el microscopio y la extracción del DNA bacteriano para medir su concentración. Hoover *et al.* (1976a, b) intentaron simular el flujo de partículas de distintos tamaños en el rumen, incorporando un filtro. En un principio se diseñó el sistema para cambiar el filtro cada 24 horas, pero pronto se comprobó que era necesario cambiarlo con más frecuencia. Czerkawski, 1986, opina que no debe ser el sistema el que marque la velocidad de flujo de las partículas, y por ello en 1977 propone el uso del RUSITEC (Rumen Simulation Technique) como un aparato relativamente simple diseñado para estudiar la distribución, síntesis y flujo microbianos en el conjunto de un sistema complejo y heterogéneo como es el ambiente ruminal.

Desde entonces los sistemas *in vitro* se han convertido en una herramienta útil también para examinar los procesos metabólicos que tienen lugar durante la fermentación de los alimentos, y se han usado para estimar la fermentación *in vivo* y analizar las cinéticas de fermentación y las propias comunidades microbianas. Suponen una simplificación importante del complejo proceso de fermentación ruminal pero generan información que es de gran utilidad para el posterior diseño de los ensayos *in vivo* (Merry *et al.*, 1990) complementando así este tipo de ensayos. Son utilizados ampliamente, por ejemplo, para comparar el efecto de diferentes dosis de un aditivo sobre distintos substratos fermentables (Busquet *et al.*, 2004; Cardozo *et al.*, 2005; Busquet *et al.*, 2006; Bodas *et al.*, 2008; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2008; Fujisawa *et al.*, 2009; Kongmun *et al.*, 2010; Tekippe *et al.*, 2012; Mateos *et al.*, 2013)

De los numerosos sistemas que se han propuesto en la bibliografía, más de la mitad no han vuelto a ser utilizados por sus autores (Czerkawski, 1986), ya que la complejidad del sistema dificulta la repetibilidad de los experimentos.

2.2 Tipos de sistemas *in vitro*

Existen diferentes formas de clasificar los sistemas de cultivo *in vitro* (Czerkawski, 1986; Blanchart *et al.*, 1989); estas clasificaciones se basan en si el sistema es abierto, permitiendo escapar así a los gases producidos durante la fermentación, o cerrado, siendo los gases recogidos; si existe o no intercambio de sólido o líquido, si poseen o no membranas semipermeables, y si la fermentación se produce de forma continua en el tiempo (semanas, o incluso varios meses) o está limitada a unas horas o unos pocos días. La duración depende de si existen entradas de alimento y solución tampón al sistema y salida de efluentes o no.

2.2.1 Cultivos no renovados de microorganismos ruminales (CNRMR)

Los CNRMR son un sistema *in vitro* de cultivo de microorganismos ruminales con un medio de cultivo tamponado y no limitante en un recipiente cerrado herméticamente en el que se ha colocado un sustrato determinado (alimento). Durante la incubación no se añade medio de cultivo, contenido ruminal, ni sustrato. El gas producido se acumula en el espacio libre que queda en el recipiente.

Cuando se incuba en el laboratorio un alimento con fluido ruminal en condiciones anaerobias y a una temperatura similar a la del rumen, los carbohidratos son fermentados por los microorganismos, produciéndose AGV (principalmente acético, propiónico y butírico; Beuvink y Spoelstra, 1992; Blümmel y Ørskov, 1993), gases (fundamentalmente dióxido de carbono, metano e hidrógeno; Van Soest, 1994) y células microbianas, al igual que ocurre *in vivo* en el rumen. Por lo tanto, la medida de la producción de gas *in vitro* puede ser utilizada para estimar la tasa y extensión de la digestión de los alimentos (Hungate, 1966) y el estudio de la cinética de fermentación.

Los gases se producen directamente como consecuencia de la fermentación del alimento, y también de forma indirecta por la neutralización de los ácidos con

el bicarbonato de la solución tampón, liberándose de forma indirecta CO_2 , aproximadamente el 60% de la producción total de gas según Getachew *et al.* (1998). Algunos autores han indicado que la mayor parte se produce cuando el sustrato es fermentado a acético y butírico, y en mucha menor medida, propiónico (Wolin, 1960; Hungate, 1966; Van Soest, 1994); sin embargo, las proporciones molares de los principales AGV producidos (acético, propiónico y butírico) dependen del tipo de sustrato (Beuvink y Spoelstra, 1992; Blümmel y Ørskov, 1993) y por ello la relación molar acético:propiónico (Ac:Pr) ha sido utilizada para evaluar diferencias en la fermentación debidas al sustrato. Los carbohidratos de fermentación rápida dan lugar a mayores cantidades de propiónico en comparación con el acético, y cuando lo que se incuba son carbohidratos de degradación lenta ocurre lo contrario (Ørskov y Ryle, 1990).

En los CNRMR se pueden aplicar las leyes estequiométricas de equilibrio, debido a que los productos de la fermentación derivan del sustrato que se incuba (Van Soest, 1994). Varios autores (Beuvink y Spoelstra, 1992; Blümmel y Ørskov, 1993; Opatpatanakit *et al.*, 1994) han encontrado una alta correlación entre la producción de gas calculada estequiométricamente y los valores reales registrados. De esta forma, si se conoce la proporción molar y la cantidad de AGV, se pueden estimar las cantidades de CO_2 y CH_4 esperadas como consecuencia de la fermentación ruminal.

La estrecha relación entre fermentación ruminal y producción de gas había sido reconocida hace más de un siglo (Tappeiner, 1882), pero hasta principios de los años 40 del siglo pasado no se diseñaron técnicas que permitieran medir el gas de fermentación (Quin, 1943). Gran parte de los primeros estudios sobre la medida del gas se han centrado en el uso de métodos manométricos. (McBee, 1953) desarrolló un método de este tipo para la evaluación de la actividad microbiana ruminal con respecto a la fermentación de la celulosa y la hemicelulosa, y concluyó que la tasa de fermentación de los diferentes sustratos

en el rumen no es constante, sino que está sujeta a amplias fluctuaciones que dependen de la composición de la dieta del animal. Utilizando este mismo método, este autor examinó la preferencia de los microorganismos por diferentes componentes del alimento, añadiendo a la dieta de ovejas donantes celulosa y posteriormente hemicelulosa, y encontró que aquellos que son capaces de fermentar la celulosa también pueden degradar las hemicelulosas, pero no al contrario. Czerkawski y Breckenridge (1969a) desarrollaron un aparato para medir manométricamente la presión con el fin de investigar el efecto de la adición de ácidos grasos en la fermentación de la pulpa de remolacha y la sacarosa por una mezcla de microorganismos ruminales. Mediante este método, observaron que durante una incubación de corta duración (6-8 horas), el patrón de fermentación de este producto era similar al que se observaba *in vivo*, mientras que la adición de ácidos grasos en forma de aceite de semillas de lino inhibía temporalmente la producción de gas. El aparato construido por estos autores consistía en cinco unidades de fermentación y permitía hacer de 4 a 5 incubaciones simultáneas al día, pero no resultaba sencillo hacer más de dos durante una semana de trabajo, ya que representaba mucho trabajo la preparación de la prueba y el análisis de todas las muestras generadas. Para superar este inconveniente, en 1970 desarrollaron un sistema de jeringas con una capacidad de diez unidades. Sin embargo, tampoco estas diez unidades fueron suficientes para aceptar el sistema como un método rutinario de evaluación de alimentos, por lo que este método no ha sido muy utilizado posteriormente.

En 1979 Menke *et al.*, a partir de datos de 89 experimentos, encontraron una alta correlación entre la producción de gas *in vitro* y la digestibilidad aparente de la materia orgánica *in vivo* y, desde este momento, la técnica de producción de gas fue adoptada como un método rutinario para predecir la digestibilidad de la materia seca con la ayuda de un modelo matemático, aunque aún no se ha encontrado una ecuación de regresión que pronostique de forma satisfactoria los

valores de degradación de un amplio rango de forrajes (Van Soest, 1994). Basándose en estos resultados, Menke *et al.* (1979) concluyeron que la predicción de la energía metabolizable es más precisa cuando está basada en medidas de gas y de constituyentes químicos, comparada con los cálculos basados únicamente en estos últimos. Este trabajo ha sido revisado posteriormente por Steingass y Menke (1986) y Menke y Steingass (1988), y otros autores (Chenost *et al.*, 1997; Fernández-Rivera, 1997; Macheboeuf *et al.*, 1997) han observado también esta correlación significativa entre la medida de gas *in vitro* y la digestibilidad *in vivo*. Los CNRMR se han utilizado también en la evaluación de la interacción entre dietas (básicas y suplementadas) incubando ambas, bien por separado, bien combinadas, y midiendo la producción de gas en diferentes horas de incubación (Sampath *et al.*, 1995; Tagliapietra *et al.*, 2014).

En el método de Theodorou *et al.* (1994), la presión acumulada en el espacio de cabeza del recipiente de fermentación se mide con un transductor de presión digital. Y el volumen de gas producido mediante una jeringa, hasta que la presión en el transductor sea igual a cero. El método de Theodorou *et al.* (1994) requería sólo un transductor de presión, mientras que en la técnica descrita por Pell y Schofield (1993) cada botella de incubación tenía su propio sensor de presión. La ventaja del método de Theodorou *et al.* (1994) es que se pueden manejar un gran número de muestras al mismo tiempo con un bajo coste. En estas técnicas la presión acumulada no siempre se libera durante el transcurso del estudio, y esto puede afectar negativamente a la fermentación microbiana. Además, un incremento en la presión puede cambiar la solubilidad de los gases en el medio, lo que puede producir errores en la medida del gas. Por ello son técnicas adecuadas para incubaciones de corta duración (horas).

La cinética de producción de gases depende de la proporción relativa de partículas (solubles / insolubles y degradables / indegradables) del alimento. Mientras que otros métodos *in vitro* están basados en medidas gravimétricas que

siguen la desaparición de componentes del sustrato que pueden contribuir a la fermentación, los CNRMR se centran en la aparición de productos de fermentación (los productos solubles pero no fermentables no contribuyen a la producción de gas), con lo cual proporcionan un valor más ajustado de la fermentación que la simple estimación gravimétrica (Blümmel y Ørskov, 1993; Pell y Schofield, 1993). En los CNRMR se puede estudiar la cinética de la fermentación en una cantidad relativamente pequeña de sustrato (300-500 mg), y también se puede evaluar y seguir en el tiempo la cinética de fermentación de un número elevado de muestras al mismo tiempo. En general, los CNRMR son de manejo sencillo y su coste no es elevado (Menke *et al.*, 1979; Theodorou *et al.*, 1994) en comparación con otros métodos *in vitro*. También permiten la incubación de una mayor cantidad de muestra incrementando el volumen de los recipientes de incubación (Hungate *et al.*, 1955). Además, requieren poca (6-10 mL por botella) cantidad de inóculo al comienzo del experimento.

Al ser un sistema cerrado, en los CNRMR no se puede simular el efecto del flujo de líquido y sólido sobre la eficiencia de síntesis microbiana ni se puede evitar la inhibición de la actividad enzimática cuando se acumulan en el medio los productos de fermentación, por lo que se pueden producir desviaciones en la estimación de los procesos fermentativos. La alta proporción de solución tampón que se mezcla con el inóculo al comenzar un experimento es necesaria para mantener los valores de pH durante el proceso fermentativo, caracterizándose por presentar altos valores de pH durante toda la incubación, no pudiendo así reproducir las oscilaciones de pH típicas del rumen; la incubación se realiza normalmente a pH entre 6,5 y 6,9.

Existen sistemas semi-automatizados como el presentado por Mauricio *et al.*, (1999) que describieron un aparato que permitía incubar 336 frascos al mismo tiempo, lo cual reducía el tiempo necesario para estudiar las características de fermentación de un elevado número de alimentos al mismo tiempo. Sin embargo,

las ventajas de la automatización son motivo de discusión. Los CNRMR automatizados permitirían la evaluación de un número elevado de muestras o tratamientos, pero ello implica una mayor demanda de mano de obra e incrementa los costes, por lo que Getachew (1998) sugiere que no tienen una amplia aplicabilidad en evaluaciones de alimento rutinarias y no son adecuados para el análisis de una gran cantidad de muestras o tratamientos.

Se da también una falta de consenso sobre distintos aspectos de los CNRMR y sus verdaderos alcances (Beever y Mould, 2000; Pell *et al.*, 2000). El principal error que se comete es asumir que la producción de gas es directamente proporcional a la digestión del sustrato, y por lo tanto a su valor nutritivo (Beever y Mould, 2000). Esto no es estrictamente cierto, ya que la producción de gas depende de la composición del sustrato, de las comunidades microbianas que se desarrollen en el cultivo y de la utilización de los nutrientes por parte de los microorganismos para su crecimiento. Por ejemplo, los alimentos precursores de ácido propiónico (en su mayor parte aquellos ricos en almidón) producen menos gas que aquellos que dan lugar a acético y butírico (Williams, 2000), y la presencia de amoníaco en forrajes ricos en proteína puede hacer decrecer la producción de gas indirecto por una reacción con los AGV, que evita que estos reaccionen con el buffer para liberar CO₂ (Schofield 2000). Como consecuencia de esto, varios autores concluyeron que la producción de gas *in vitro* proporciona poca información aparte de la estimación de las tasas de fermentación, por lo que se sugirió que los datos obtenidos deberían ser complementados con datos de degradación de los sustratos, perfiles de AGV y crecimiento bacteriano (Blümmel y Bullerdick, 1997; Blümmel *et al.*, 1997; Beever y Mould, 2000). Así, la producción de gas *in vitro* complementada con análisis químicos en el residuo (como la fibra neutro detergente (FDN), fibra ácido detergente (FAD) o materia orgánica (MO)) permite ofrecer una información más precisa acerca del valor nutritivo de los alimentos. En este enfoque, la determinación del residuo y su composición

química nos indica cuánto sustrato se ha utilizado realmente en la fermentación, y la medida de gas indica cuánto de este sustrato fermentado se convierte en AGV y gases. Ha sido demostrado (Blümmel, 2000; Rymer *et al.*, 2005) que la medida de la producción de gas *in vitro*, cuando se combina con medidas de la degradabilidad real del sustrato, es un método adecuado para predecir el reparto del alimento degradado entre la síntesis de proteína microbiana y los AGV (proporción del alimento que es fermentado y del que es derivado al crecimiento microbiano), así como el CO₂, CH₄ y H₂ producidos.

Además de haber sido ampliamente utilizados para evaluar la calidad nutritiva de los alimentos (Pell *et al.*, 1998), los CNRMR se pueden utilizar para la estimación de la actividad microbiana (Williams *et al.*, 2000; Macheboeuf *et al.*, 2008), la evaluación de la toxicidad de algunos compuestos secundarios (Min *et al.*, 2003; Ammar *et al.*, 2004) y el estudio del efecto de algunos aditivos alimentarios en la fermentación ruminal (Carro y Ranilla, 2003; Colombatto *et al.*, 2003; Carro *et al.*, 2005; Busquet *et al.*, 2006; Calsamiglia *et al.*, 2007; Giraldo *et al.*, 2007; Benchaar *et al.*, 2008; Klevenhusen *et al.*, 2011; Chaudhry y Khan, 2012; Tekippe *et al.*, 2012, Mateos *et al.*, 2013).

2.2.2 Fermentadores

En 1965, Hobson reconoció la analogía entre el rumen y los sistemas de fermentadores de cultivo continuo, y posteriormente se han hecho numerosos intentos para diseñar nuevos sistemas de fermentadores que permitieran mantener los cultivos más tiempo que los CNRMR. Estos sistemas fueron simples en el comienzo y paulatinamente fueron derivando en métodos más complejos, en los que los diferentes investigadores iban introduciendo modificaciones con el fin de obtener resultados cada vez más relacionados con los obtenidos *in vivo*. Los sistemas más complicados son capaces de mantener la fermentación durante semanas; en la mayor parte de ellos las tasas de renovación de sólidos y líquidos

pueden ser fijadas independientemente, y los productos finales son retirados del sistema por extravasación, filtración o diálisis.

Los sistemas de cultivo continuo, como el resto de sistemas de fermentación *in vitro*, presentan ventajas e inconvenientes. No son aptos para incubaciones a corto plazo, ya que requieren varios días de adaptación de los microorganismos al nuevo ambiente. Requieren, además, de un equipamiento complejo (sistema de infusión de líquido, sistema de regulación constante del pH, sistema de agitación, de control de temperatura y de salida continua de gas) para mantener las condiciones de simulación del ambiente ruminal.

Se han propuesto muchos modelos diferentes, entre ellos los de Slyter *et al.*, 1964; Aafjes y Nijhof, 1967; Weller y Pilgrim, 1974; Ewart, 1974; Hoover *et al.*, 1976a, b; Czerkawski y Breckenridge, 1977; Crawford *et al.*, 1980a, b; Abe y Kurihara, 1984; Czerkawski, 1986; Teather y Sauer, 1988; Fuchigami *et al.*, 1989; Hino *et al.*, 1993; Muetzel *et al.*, 2009.

Algunos autores (Abe y Kumeno, 1973; Nakamura y Kurihara, 1978) intentaron simular *in vitro* la absorción de productos finales de la fermentación a través de las paredes ruminales mediante el uso de membranas semipermeables de diálisis. Estos modelos son muy complejos y en ellos no se pueden incubar sustratos sólidos, por lo que su uso no está muy extendido.

Mientras que los CNRMR son cerrados (sin entradas ni salidas de sólido o líquido), los fermentadores son cultivos de tipo continuo que permiten estas entradas y salidas. Se pueden clasificar en:

2.2.2.1 Sistemas de fermentación y flujo continuos (*continuous culture fermenters, CCF*), con entrada continua de solución tampón y sustrato y salida de efluente líquido y sólido de forma ininterrumpida. Dentro de este grupo están los de flujo simple donde sólido y líquido salen a la vez, como el modelo de Teather y Sauer (1988), que se basa en la estratificación del contenido del fermentador y

su salida homogénea simulando la del contenido ruminal; y los de flujo doble, en los que sólidos y líquidos entran independientemente, como el de Hoover *et al.* (1976a, b), que presenta un flujo diferenciado de entrada y salida de las fases sólida y líquida con el fin de intentar mantener estables las comunidades microbianas más sensibles a ritmos de paso elevados.

En estos sistemas tanto la fase líquida como la sólida fluyen de forma ininterrumpida fuera del sistema. En los de flujo continuo simple la tasa de dilución para el sólido y el líquido es la misma, ya que salen del fermentador a la vez. En los sistemas de flujo doble se mantienen tasas de dilución independientes para líquidos y sólidos, lo que simula la renovación diferencial que tiene lugar en el ambiente ruminal. Los sistemas de cultivo continuo de flujo doble han proporcionado razonables estimaciones de la fermentación ruminal, y han sido empleados en una gran cantidad de estudios (Calsamiglia *et al.*, 1995 y 1999; Mansfield *et al.*, 1995; Carro y Miller, 1999; Schadt *et al.*, 1999; Busquet *et al.*, 2005; Fraser *et al.*, 2007; Muetzel *et al.*, 2009; Chaves *et al.*, 2009; Carro *et al.*, 2009; Soto *et al.*, 2012; Abecia *et al.*, 2014; Martínez-Fernández *et al.*, 2015).

Una ventaja de estos sistemas es que no es necesario parar el motor ni abrir los fermentadores en ningún momento para introducir el alimento, evitando así que los microorganismos se expongan al oxígeno. Sin embargo, presentan inconvenientes como la posibilidad de atascos en el sistema de salida o la homogeneidad del contenido del fermentador, que no reproduce la estratificación existente en el rumen. No obstante, algunos modelos, como el de Teather y Sauer (1988) han tratado de simular este fenómeno mediante la agitación suave producida por una pequeña hélice introducida en el fermentador. En algunos CCF se introdujeron modificaciones que simularan la permeabilidad de la pared del rumen (lo que posibilita la retirada de productos finales) colocando una membrana semipermeable (Warner, 1956; Davey *et al.*, 1960; Hungate, 1966). Sin embargo, según Czerkawski, en 1986, el uso de

membranas semipermeables tiene inconvenientes: es difícil que la membrana no sea atacada por los microorganismos, no se puede usar sustrato sólido y es difícil controlar el flujo por ósmosis. Por otro lado, al existir una entrada más o menos continua de alimento en el sistema, resulta difícil simular las oscilaciones diarias del pH (Carro *et al.*, 2005), situación que se produce *in vivo* cuando los animales comen una o más veces al día.

2.2.2.2 Sistemas de fermentación continua y de flujo semi continuo, con entrada continua de solución tampón, entrada y salida puntuales de sustrato (alimentación intermitente) y salida continua del efluente líquido. El tipo más conocido es el RUSITEC (Rumen Simulation Technique; Czerkawski y Breckenridge, 1977) y es en el que mayor número de trabajos se ha utilizado, tanto en su versión original o con modificaciones (Blanchart y Vignon, 1984; Carro *et al.*, 1992; Carro *et al.*, 1995).

En los sistemas de cultivo continuo, los fermentadores se inoculan al comienzo del experimento con contenido ruminal líquido y sólido. Posteriormente, se bombea continuamente una solución tampón a una velocidad conocida y fija, con lo que la salida del efluente también se produce a velocidad constante. El alimento se administra (automática o manualmente) en dosis repartidas en el tiempo (Hoover *et al.*, 1976a, b; Teather y Sauer 1988) o mediante introducción diaria y puntual en bolsas de nailon, como en el RUSITEC (Czerkawski y Breckenridge, 1977).

En este sistema, la entrada de solución tampón a una velocidad prefijada produce un flujo más o menos constante de salida de productos de fermentación y microorganismos junto con la fase líquida, mientras que la sólida es introducida en bolsas porosas en el interior de los fermentadores y retirada de forma puntual, manualmente, a intervalos de tiempo constantes. El alimento se puede incubar en conjunto o bien separándolo según su naturaleza, por ejemplo

Capítulo 2

el alimento fibroso en una bolsa y el concentrado en otra, ambas dentro del mismo fermentador, ya que la separación espacial de los componentes del alimento no resulta en una fermentación anormal (Czerkawski y Breckenridge, 1978).

En un RUSITEC, como en el rumen, los microorganismos de la fase líquida se separan de los que están asociados a la masa sólida de alimento, en este caso contenida en el interior de las bolsas de nailon. El intercambio entre estas fracciones microbianas es posible gracias a la perfusión continua del líquido a través del sólido (Czerkawski y Breckenridge, 1977). Gizzi *et al.* (1998) asumieron que este sistema *in vitro* alberga comunidades microbianas que representan el ecosistema natural del rumen. Sin embargo, se necesita una estandarización del procedimiento de muestreo y de los parámetros de incubación para permitir una mejor comparación de los datos entre laboratorios.

Czerkawski en 1986 resume las ventajas del RUSITEC en algunos puntos clave:

-Se proporciona al operador el máximo control sobre las condiciones experimentales, por encima de los fermentadores de flujo continuo (CCF). Permite determinar de forma precisa todas las entradas y salidas, incluyendo los gases.

-El alimento se puede administrar en estado sólido y en una forma similar a la que reciben los animales *in vivo*, y así el sistema puede reproducir las condiciones heterogéneas del rumen.

-La cantidad de sólido que abandona los fermentadores se conoce de forma precisa, porque se retira manualmente.

-Permite realizar incubaciones con sus respectivas réplicas de forma simultánea en el tiempo (un RUSITEC estándar posee ocho fermentadores

independientes que se mantienen bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación).

Además, según Carro *et al.*, 2005, las fluctuaciones del pH que ocurren en el RUSITEC parecen ser similares a las que ocurren *in vivo* en comparación con un CCF.

El tiempo requerido para alcanzar el estado estacionario, entendiendo este como aquel en el que la salida diaria de productos de fermentación (AGV, NH₃ y lactato) no varía de forma significativa durante varios días consecutivos, es de 4 a 6 días según Czerkawski y Breckenridge, 1977. Estimar correctamente cuanto es el tiempo de adaptación al sistema representa una dificultad en el uso del sistema RUSITEC. Es necesario esperar a que las comunidades microbianas alcancen un equilibrio que, además, es diferente al que había en el inóculo (Prevot *et al.*, 1994).

Al comenzar una incubación, se añade un gran volumen de saliva artificial (McDougall, 1948) al fluido ruminal, conduciendo a un rápido aumento en el pH y por tanto a la modificación de las condiciones respecto a las existentes en el rumen en el momento de recogida del inóculo. La regulación del pH durante la incubación depende de la entrada de saliva gracias a las bombas peristálticas. En el RUSITEC es necesario detener el motor del aparato y abrir los fermentadores una vez al día para introducir nuevas bolsas de nailon con alimento. Esta operación expone a los microorganismos ruminales al oxígeno y el equilibrio entre las comunidades microbianas (en este caso la relación anaerobios estrictos/facultativos) puede verse alterado.

2.3 Factores que afectan a la fermentación *in vitro*

Hay un número considerable de factores que afectan a la fermentación de los alimentos por los microorganismos ruminales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Trei *et al.*, 1970; Beuvink y Spoelstra, 1992; Getachew, 1998). Por tanto, hay que tener en cuenta estos factores para poder optimizar la digestión *in vitro*. Las variaciones en

las condiciones de los cultivos *in vitro* pueden afectar a las comunidades microbianas que en ellos se establecen (Slyter y Putnam, 1967). Según Getachew (1998) es necesaria la estandarización de procedimientos para poder realizar comparaciones entre distintos estudios, así como el desarrollo de medios matemáticos para corregir las diferencias que entre ellos pudieran presentarse.

Los factores que afectan a la fermentación pueden ser clasificados de diferentes maneras y en esta monografía se clasificarán en cuatro grupos: 1) Relacionados con el inóculo del animal, 2) Relacionados con la preparación del cultivo, 3) Relacionados con el substrato incubado y 4) Relacionados con el manejo de los sistemas *in vitro* y con el ambiente.

2.3.1. Relacionados con el inóculo del animal

En las técnicas de fermentación ruminal *in vitro*, la especie a la que pertenece el animal donante afecta a los resultados. Aunque las comunidades microbianas ruminales de las especies animales similares (ovejas, cabras) que están confinadas en contacto estrecho y que consumen alimentos parecidos o iguales pueden tender a la uniformidad, las diferencias intraespecíficas influyen en la microbiota (Ammar *et al.*, 2004). En la medida de lo posible, el inóculo para los ensayos *in vitro* debería siempre ser obtenido de animales similares (misma raza, edad, peso y sexo), y alimentados con las mismas dietas. Además, es importante que las muestras de varios animales sean combinadas para reducir la variabilidad (Williams, 2000) porque este factor entre animales, como se ha demostrado mediante técnicas *in situ*, puede ser mayor que la variabilidad diaria en un mismo animal (Mehrez y Ørskov, 1977).

Las condiciones de manejo de los animales donantes, su dieta y el momento de recogida del inóculo pueden tener efecto en la coherencia de los resultados entre pruebas. La dieta que reciben los animales donantes también es importante, pudiendo variar la capacidad degradativa del inóculo en función del alimento

ingerido por el animal (Cone *et al.*, 1989; Richards *et al.*, 1995). Tanto la composición de la dieta como la disponibilidad de nutrientes son importantes factores que influyen sobre el crecimiento microbiano en el rumen y la microbiota ruminal más compleja se obtiene cuando se les ofrece dietas mixtas a los animales (Mould *et al.*, 2005).

Numerosos autores (Warner, 1966 a, b; Bryant y Robinson, 1968; Leedle *et al.*, 1982; Payne *et al.*, 2002; Saro *et al.*, 2012) han observado que la estructura de las comunidades microbianas que habitan el rumen experimenta cambios cíclicos ligados a la administración del alimento por lo que la hora a la que se administra el mismo debe ser tomada en cuenta para recoger el inóculo. En las primeras horas tras la administración de alimento, se produce un marcado descenso en la cifra total de bacterias en el rumen (Saro *et al.*, 2012). Warner (1966 a, b) atribuyó esto al efecto de dilución de la comida, el agua de bebida y la saliva producida y Payne *et al.* (2002) sugieren un descenso en la actividad del inóculo ruminal recogido poco tiempo después de alimentar al animal relacionado con el bajo pH del rumen en el momento de muestreo. 8 horas después de la ingestión de la comida se incrementa la cantidad de bacterias totales hasta valores similares a los encontrados antes del suministro del alimento (Saro *et al.*, 2012). Hay que tener en cuenta que la concentración de bacterias ruminales es un balance entre el crecimiento bacteriano y su lisis, la dilución por la comida y el intercambio de partículas, y todos estos factores dependen del nivel de ingestión y del tipo de comida (Saro *et al.*, 2012).

Existe cierta controversia sobre la tasa de actividad microbiana en el inóculo y el momento óptimo de recogida para su uso en pruebas *in vitro*. Menke y Steingass (1988) sugirieron que existía una actividad microbiana óptima si los animales donantes han sido alimentados en las 16 horas previas y observaron que se redujo la variación en la composición y actividad del inóculo al muestrear el contenido ruminal justo antes de la alimentación de los animales, por lo cual

este fue el momento escogido para la recogida del contenido ruminal utilizado en las pruebas de esta Tesis Doctoral. Sin embargo, Cone *et al.* (1996) indican un incremento en la tasa de fermentación cuando el inóculo es recogido inmediatamente después de la administración del alimento. Payne *et al.* (2002) observaron que el perfil de producción de gases de diferentes substratos fue menos variable entre réplicas y entre semanas cuando el fluido ruminal fue recogido a las 4 o a las 8 horas después de alimentar a los animales, comparado con el obtenido justo antes o 2 horas después de alimentarlos.

Una vez extraído el fluido ruminal, debe depositarse en un recipiente hermético para evitar la exposición al aire y la luz y conservar la temperatura. También es importante tratar que el incremento de la presión en el espacio libre del recipiente no haga que el CO₂ entre en solución en el fluido descendiendo el pH (Rymer *et al.*, 2005). El transporte es ideal que sea lo más rápido posible para evitar una fermentación excesiva durante este periodo, y prevenir que cualquier especie o grupo se vuelva dominante y reduzca o modifique la actividad del inóculo.

Existe la posibilidad de conservar el inóculo para utilizarlo, si fuera necesario, posteriormente. Sin embargo, en la bibliografía no hay un acuerdo de cuál es la mejor forma de conservarlo (congelado o refrigerado), ni de cuánto tiempo podría almacenarse sin comprometer los resultados del experimento posterior (Cone *et al.* (2000); Robinson *et al.* (1999); Hervás *et al.* (2005)).

Se ha comprobado que, en ocasiones, las comunidades microbianas existentes en el inóculo son diferentes a las del rumen (Ziemer *et al.*, 2000) debido por ejemplo a que la muestra recogida no es representativa del conjunto de microorganismos ruminales (Sadet *et al.*, 2007).

Los CNRMR y los CCF, se inoculan solamente con la fase líquida del contenido ruminal, siendo el contenido previamente filtrado, normalmente, a

través de varias capas de gasa. Sin embargo, en los fermentadores de flujo semicontinuo, como el RUSITEC, se separa el inóculo en sus dos fases, líquida y sólida, y se inoculan con ambas: la fase líquida, mezclada con saliva forma el inóculo líquido con el que se rellenan las vasijas y la fase sólida se introduce en una bolsa de nailon que permanece en el fermentador 24 horas. El objetivo de filtrar el contenido es eliminar las partículas groseras del alimento, que al fermentar junto con el alimento introducido en el sistema, podrían interferir con los resultados (Pell y Schofield, 1993). Sin embargo, Craig *et al.*, (1984) sugirieron que el inóculo sería más efectivo si se añadiera una fracción de las bacterias asociadas a la fase sólida (BAS), mejorando los índices *in vitro* de digestión de la fibra y degradación de la proteína. En ocasiones se trata de aumentar la presencia de bacterias asociadas a la fase sólida homogenizando el contenido antes de filtrarlo o resuspendiendo el residuo sólido en solución tampón y filtrándolo de nuevo (Colombatto *et al.*, 2003; Griswold *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2004). Hay que tener en cuenta también el tamaño de poro del material utilizado para filtrar puesto que un tamaño de poro demasiado pequeño podría retener microorganismos de gran tamaño como los hongos y sobre todo los protozoos. Por otra parte, si no se realiza un tratamiento de desligamiento de las bacterias asociadas a la fase sólida (mayoritariamente celulolíticas) del fluido ruminal antes de utilizarlo, se corre el riesgo de eliminarlas del inóculo distorsionando los resultados de los experimentos. Sin embargo, algunos de los métodos físicos utilizados para el desligamiento, como el Stomacher® o el procesado con batidoras de varillas tienen también inconvenientes ya que, pueden comprometer la integridad de las células, liberando enzimas endógenas que se añadirían con el inóculo, en lugar de inocular con las células viables completas. Algunos trabajos (Mackie *et al.*, 1983; Ramos *et al.*, 2009; Fliegerova *et al.*, 2014) han analizado la influencia del tratamiento del contenido ruminal sobre las poblaciones de bacterias y protozoos en el fluido obtenido. Mackie *et al.* (1983) observaron que el tratamiento del inóculo con Stomacher® o Ultra-Turrax® aumentaba la cantidad

de bacterias y disminuía la de protozoos cuando la alimentación de las ovejas donantes era heno y viceversa cuando eran alimentadas con concentrado. Ramos *et al.* (2009) estudiaron tres tratamientos de desligamiento de bacterias asociadas a la fase sólida: incubación del inóculo con solución salina y metilcelulosa, Stomacher® y congelado del contenido ruminal para tratarlo con Stomacher® una vez descongelado y mezclado con solución salina, obteniendo que el tratamiento con Stomacher® es el más efectivo desligando bacterias. Fliegerova *et al.* (2014) estudiaron cómo influye el tratamiento del inóculo y el modo de almacenamiento de las muestras en dos grupos bacterianos (bacteroides y firmicutes). Sin embargo, la información sobre otras comunidades microbianas ruminales que intervienen en el proceso fermentativo es más limitada (Soto *et al.*, 2012). Soto *et al.* (2012) observaron un descenso en las concentraciones de bacterias hongos y arqueas en el líquido ruminal obtenido después del filtrado del contenido ruminal y esto fue atribuido a una pérdida de bacterias asociadas a la fase líquida. Rymer *et al.* (1999) examinaron cuatro métodos de preparación del inóculo: filtrado, homogeneizado con batidora, tratado en un Stomacher® o filtrado con homogeneizado posterior, encontrando que el único tratamiento que reducía la degradación era el homogeneizado, concluyendo que parece haber pocas ventajas en homogeneizar el inóculo, especialmente porque esto supone una mayor exposición de los microorganismos ruminales al oxígeno. Aunque homogeneizar el fluido ruminal puede incrementar ligeramente el número de bacterias asociadas a la fase sólida en el inóculo, Pell y Schofield (1993) eliminaron este paso de su técnica, y no observaron un efecto aparente en los resultados de la fermentación ni del perfil de producción de gases, sugiriendo que el simple filtrado del inóculo proporciona una adecuada preparación.

2.3.2. Relacionados con la preparación del cultivo

El medio de cultivo utilizado en las técnicas *in vitro* está compuesto por una solución tampón, macro y microelementos minerales, fuentes de proteína y

agentes reductores. Cuando la solución tampón contiene bicarbonato en su composición, esto complica la interpretación de los resultados del perfil de producción de gases, debido a la producción indirecta de gas que se produce entre los iones bicarbonato y los ácidos producidos durante la fermentación. Sin embargo, es un componente muy importante en el sistema amortiguador del rumen, y es usualmente incluido en los medios de cultivo para simular las condiciones ruminales de forma precisa (Rymer *et al.*, 2005). Se investigó entonces la sustitución del bicarbonato por fosfato (Omed *et al.*, 1998) aunque los fosfatos también podrían alterar el resultado de la incubación, ya que aumentan la digestión de la fibra (Kennedy *et al.*, 2000). En un trabajo en el que se evaluaron diferentes medios de cultivo (Rymer *et al.*, 2005) se comprobó que el medio descrito por Goering y Van Soest (1970) no producía significativamente más gas que otros evaluados mientras que fue capaz de mantener el pH por encima de 5,5 durante el desarrollo de la incubación, cosa que los otros no consiguieron.

Por otra parte, Grant y Mertens (1992) sugirieron la necesidad de que el medio de cultivo no debía limitar de ninguna forma el crecimiento microbiano y para ello se añaden al medio macro y micronutrientes, así como fuentes de nitrógeno. El medio de incubación, incluyendo la contribución del N del alimento, debería contener al menos 80 mg N/ L, para maximizar la tasa de degradación de los carbohidratos (Dryhurst y Wood, 1998) siendo el requerimiento de N dependiente del aporte de carbohidratos y cuanto más se incrementa el aporte de carbohidratos (especialmente los rápidamente fermentables), más N requieren los microorganismos para alcanzar tasas óptimas de crecimiento.

En los fermentadores se simula la producción de saliva por parte del animal con una entrada constante de solución tampón en el sistema. En condiciones naturales, cuando los animales toman una dieta con mayor proporción de forraje aumentara su tiempo de rumia y, por tanto, la cantidad de saliva producida será mayor; sin embargo, en condiciones *in vitro* se suele utilizar la misma cantidad de

saliva independientemente de la dieta. Existen trabajos (Colombatto *et al.*, 2003; Carro *et al.*, 2009) en los que se ha variado la composición de la saliva con el fin de variar la capacidad tampón en función de la dieta utilizada en el fermentador. Si se aumenta la velocidad de infusión de saliva en los fermentadores se aumenta la capacidad tampón del sistema y se evita que descienda el pH, lo que puede llevar a una distorsión en los resultados de la simulación (Carro *et al.*, 2009).

En cuanto a la proporción fluido ruminal:medio de cultivo, al aumentar la proporción de fluido ruminal en el medio de incubación aumentó el volumen (Wood y Bhat, 1988) y la tasa de producción de gas (Pell y Schofield, 1993; Rymer *et al.*, 1999) y se redujo el tiempo que tardan los microorganismos en colonizar y atacar las partículas del substrato incubado (Pell y Schofield, 1993). Estos mismos autores recomendaron para CNRMR una proporción 1:4 de líquido ruminal:medio de cultivo para así reducir la posibilidad de que una baja cantidad de inóculo limitara la producción de gas.

2.3.3. Relacionados con el substrato incubado

La cantidad de substrato a incubar varía en los diferentes trabajos pero siempre se ha de tratar de encontrar un equilibrio. Si la cantidad de substrato incubada es demasiado pequeña puede haber más errores en la simulación ya que la muestra de substrato puede no ser representativa de la dieta que se pretende incubar, sobre todo si esta es muy heterogénea (Pell y Schofield, 1993). Por otra parte, si la cantidad de substrato es excesiva la acumulación de gas en el espacio de cabeza puede llegar a inhibir la fermentación, distorsionando los resultados obtenidos.

El tamaño de partícula del substrato incubado también puede influir en los resultados obtenidos. Se ha observado un incremento de la digestibilidad *in vitro* al disminuir el tamaño de partícula (Cone *et al.*, 1989). En todos los substratos la tasa de producción de gas aumenta a medida que se disminuye el tamaño de

partícula (Menke y Steingass, 1988; Lowman *et al.*, 2002) debido a que así se favorece el acceso de los microorganismos al alimento y aumenta su fermentación. Esto, sin embargo, representa un problema para determinar las cinéticas de degradación de los substratos ya que en el rumen del animal las partículas de alimento van disminuyendo paulatinamente de tamaño y este hecho es difícilmente reproducible *in vitro* (Lowman *et al.*, 2002). Es preciso estandarizar el modo de preparación del alimento antes de realizar la cinética de producción de gas para que los datos obtenidos puedan ser comparables entre diferentes experimentos o laboratorios.

Otro aspecto que puede afectar a la fermentación *in vitro*, además del tamaño de partícula, es el tratamiento previo al que se haya sometido al substrato. Lowman *et al.* (2002) indicaron que muestras secadas en microondas, estufa o liofilizadas y utilizadas en cultivos de tipo discontinuo producían más gas que las muestras frescas o congeladas, sugiriendo que las primeras se pudieron en el proceso de secado, haciéndolas más fácilmente degradables. Este tipo de factores deben ser considerados cuando se utilicen los datos obtenidos *in vitro* para predecir la fermentabilidad de un alimento *in vivo*.

2.3.4. Relacionados con el manejo de los sistemas *in vitro* y con el ambiente

El gas acumulado en el espacio de cabeza libre de las botellas de incubación *in vitro* de los CNRMR puede afectar a la fermentación del substrato incubado y por tanto a la cantidad de gas que se produce. Theodorou *et al.* (1994) sugirieron que en un sistema donde no se vacía el gas de las botellas durante la incubación (Pell y Schofield, 1993) se produce menos gas total ya que el gas acumulado puede inhibir la fermentación. A presiones mayores de 7 psi se alteraba el crecimiento microbiano produciéndose una inhibición de la fermentación. Para evitar que el aumento de la presión afecte al crecimiento de los microorganismos se ha propuesto aumentar el espacio libre en la botella o disminuir la cantidad de substrato incubado (Pell *et al.* 1998).

Capítulo 2

La acumulación de gas en el espacio de cabeza afecta a los perfiles de producción de gas y también refleja diferencias en el área de la superficie del medio de cultivo incubado con el espacio de cabeza, a través de la cual se produce el intercambio de gases de la fermentación entre el medio y espacio libre en la botella, siendo este más fácil en cultivos con una mayor área de superficie (Rymer *et al.*, 2005).

Lowman *et al.* (1998) utilizando un medidor manual de presión, variaron la presión del espacio de cabeza utilizando diferentes intervalos entre medidas de la presión de gas. No varió la producción de AGV ni el porcentaje de MS degradada, pero si se modificó el perfil de producción de gas, liberándose desde el cultivo menos gas cuando este era medido cada seis horas que cuando era medido cada dos horas. Por otra parte Mauricio *et al.* (1999) observaron un aumento en el volumen de gas cuando el intervalo de medición era aumentado de una a tres horas, afectándose además algunos parámetros de la cinética de fermentación cuando se realiza la medición cada hora, sugiriendo que el aumento de la frecuencia de lectura reduce el error asociado a la medición.

La presión atmosférica podría, a priori, influir en los resultados de medida de gas y su efecto sería especialmente importante al comparar resultados obtenidos en laboratorios situados en altitudes muy diferentes (Theodorou *et al.*, 1994) o cuando se producen cambios muy acusados en la presión atmosférica, sin embargo Rymer *et al.*, (2005) concluyeron que la mayoría de cambios en la presión atmosférica no son suficientes para provocar efectos en el perfil de producción de gas.

No está claro si la agitación de los cultivos puede afectar o no a los resultados obtenidos. Wilkins (1974) mostró una ausencia de efecto de la agitación en el tiempo que tardan los microorganismos en colonizar comenzar a digerir las partículas del substrato incubado, pero se observó que los cultivos que se

agitaban liberaban más cantidad de gas respecto a los cultivos que permanecían sin agitación. Sin embargo Stevenson *et al.* (1997) no observaron cambios en el patrón de fermentación, ni en la producción de biomasa microbiana cuando el medio de incubación era agitado. En una comparación entre laboratorios entre el sistema automático de Cone (1996), en el que se agita el medio, y el de Davies (2000), en el que no se agita, no se encontraron diferencias entre aparatos, sugiriendo que agitar el medio tiene relativamente poco efecto en la reproductibilidad de los resultados (Rymer *et al.*, 2005). En los fermentadores de flujo continuo existe una agitación mediante palas giratorias, mientras que en los semicontinuos la agitación se realiza mediante el movimiento vertical de ascenso y descenso.

La duración de la incubación también puede influir en los resultados obtenidos. Normalmente los experimentos con CNRMR suelen tener una duración reducida (horas) y los fermentadores se mantienen en funcionamiento durante tiempos más largos (dos o tres semanas).

Para simular la estratificación que se produce en el contenido ruminal en los fermentadores se introduce el alimento en bolsas de nailon (Czerkowski y Breckenridge, 1977) o a través de un sistema de doble flujo por filtración (Hoover *et al.*, 1976a, b), mediante cambios en la velocidad de agitación, o por selección de las partículas por su densidad. Varios autores han intentado reproducir esta estratificación con resultados más o menos prometedores (Teather y Sauer, 1988; Fuchigami, 1989; Muetzel *et al.*, 2009).

La tasa de dilución, que es la cantidad de saliva (o medio de cultivo) que pasa al recipiente de incubación durante un período de tiempo determinado, y el tiempo de retención del sólido, que es el tiempo que permanece el alimento en la vasija de incubación, afectan a la fermentación ruminal y el crecimiento microbiano. Hay estudios que han indicado una mayor producción de AGV y

crecimiento microbiano al aumentarse la tasa de dilución (Stern y Hoover, 1979; Meng *et al.*, 1999), y al disminuir el tiempo de retención del sólido (Hoover *et al.*, 1982; Shriver *et al.*, 1986; Schadt *et al.*, 1999) mientras que otros autores no han encontrado efectos en la producción de AGV (Isaacson *et al.*, 1975; Hoover *et al.*, 1984; Eun *et al.*, 2004) o en el crecimiento de los microorganismos (Hoover *et al.*, 1984). La tasa de dilución del contenido líquido y el tiempo de retención de la digesta sólida en el rumen pueden ser muy variables *in vivo*, y dependen de la especie animal, el estado fisiológico, las características de la dieta y el nivel de ingestión, entre otros factores (Colucci *et al.*, 1990; Stern *et al.*, 2006). La tasa de dilución y el tiempo de retención del sólido afectan a la fermentación ruminal, a la digestibilidad del alimento y a las comunidades microbianas tanto *in vivo* como *in vitro* (Abe y Kumeno, 1973; Crawford *et al.*, 1980a; Hoover *et al.*, 1984; Meng *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2001).

En los experimentos *in vitro*, la forma de conseguir tasas de dilución más elevadas es incrementar el volumen de saliva artificial o solución tampón que entra en el sistema por unidad de tiempo. A su vez, al aumentarse la capacidad amortiguadora en el sistema, se evita que disminuya el pH. Hoover en 1984 apuntó que a tiempo de retención constante, el efecto del pH podría ser más importante que el de la tasa de dilución per se en el control de la digestión ruminal, pero en este tipo de estudios los efectos de la tasa de dilución y del pH en la fermentación y la síntesis de proteína microbiana no pueden separarse.

En los fermentadores de flujo continuo simple (Meng *et al.*, 1999) las fracciones sólida y líquida salen a la vez del sistema, y por lo tanto si se aumenta la tasa de dilución se provoca una disminución del tiempo de retención del sólido. Los fermentadores de flujo continuo doble (Hoover *et al.*, 1984, Schadt *et al.*, 1999) permiten que las fracciones líquida y sólida abandonen el sistema separadamente, por lo que se puede controlar mejor el tiempo de retención de la fase sólida. En sistemas de flujo semicontinuo, como el RUSITEC, la fracción

sólida se retira del sistema manualmente a tiempos prefijados y por tanto el tiempo de retención del sólido no se ve afectado por la dilución.

En la mayoría de trabajos realizados con fermentadores RUSITEC el substrato se incuba durante 48 horas, pero *in vivo* el tiempo de retención del concentrado es menor que el de los alimentos más fibrosos (Mambrini y Periyaud, 1997). Gracias a la posibilidad de incubar los substratos individualmente en este tipo de fermentadores, el concentrado puede permanecer 24 h mientras que el forraje se incuba durante 48 h para que su tiempo de retención sea similar a lo que acontece *in vivo*, obteniéndose de esta manera perfiles de AGV parecidos a los encontrados *in vivo* (Martinez *et al.*, 2009).

El tiempo de retención y la tasa de dilución podrían, a priori, afectar a distintos parámetros relacionados con la fermentación. Algunos autores han reportado mayor desaparición de la materia seca, FND y FAD al aumentar la tasa de dilución (Crawford *et al.*, 1980a; Eun *et al.*, 2004; Fondevila y Pérez-Espés, 2008) mientras otros no observaron este efecto (Czerkawski y Breckenridge, 1977; Carro *et al.*, 1995). Se ha demostrado que un mayor tiempo de retención provocará una mayor desaparición aparente de la materia seca, FND y FAD (Crawford *et al.*, 1980a; Shriver *et al.*, 1986; Schadt *et al.*, 1999). La producción y el perfil de AGV también se ven afectados por el tiempo de retención del sólido y la tasa de dilución, con efectos variables dependiendo de los diferentes trabajos. Stern y Hoover (1979) y Crawford *et al.* (1980a) encontraron que una alta tasa de dilución incrementaba la producción total de AGV, mientras que otros encuentran que este parámetro no afecta a la producción de AGV (Hoover *et al.*, 1984; Isaacson *et al.*, 1995; Eun *et al.*, 2004) o la hace disminuir (Carro *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 1999). En algunos experimentos con RUSITEC cuando se utilizan dietas con elevada proporción de concentrado se han observado relaciones Ac:Pr no fisiológicas y concentraciones anormalmente elevadas de caproico que no aparecen *in vivo* (Gómez *et al.*, 2005; Carro *et al.*, 2009), hecho que se ha atribuido

a que el concentrado permanece 48 horas dentro del fermentador, tiempo superior al que permanecería en el rumen y a tasas de dilución bajas que fomentan una mayor acumulación de productos finales. En lo referente a la producción de metano, los resultados también son contradictorios. Isaacson *et al.* (1975) encontraron un descenso en la producción de este gas al aumentar la tasa de dilución que podría ser debido al descenso de la abundancia de arqueas metanogénicas a altas diluciones. Sin embargo, Eun *et al.* (2004) observaron que con mayores tasas de dilución se produjo mayor cantidad de metano.

El uso de fermentadores continuos y semicontinuos, que permiten incubaciones de larga duración (semanas), provoca cambios cualitativos y cuantitativos en las comunidades microbianas a lo largo del periodo de estudio. Recientes trabajos (Soto *et al.*, 2012; Soto *et al.*, 2013) han evaluado, utilizando técnicas moleculares, los cambios en las poblaciones microbianas durante el periodo de incubación en fermentadores de flujo continuo, observando que la estructura de las comunidades bacterianas y la abundancia de algunos grupos microbianos (bacterias, hongos y arqueas) se ven afectadas, disminuyendo su abundancia después del filtrado del contenido ruminal, debido a la exposición del contenido al oxígeno y a la pérdida de microorganismos asociados a la fase sólida. Sin embargo, no se detectó impacto negativo sobre los parámetros fermentativos, indicando que se puede reducir el tiempo necesario para la adaptación de los fermentadores. En un estudio (Soto *et al.*, 2013) en el que se evaluó el desarrollo de los microorganismos, mediante PCR cuantitativa y la técnica del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción terminales, los CNRMR mostraron importantes cambios en las abundancias de los microorganismos y en el perfil de especies bacterianas con una menor diversidad bacteriana que en el inóculo, pero un sustancial crecimiento de bacterias fibrolíticas que apoya el uso de esta técnica para el análisis de substratos fibrosos, mientras que los CCF mantienen una microbiota y una estructura de las

comunidades bacterianas más estables y parecidas a las del contenido líquido del rumen, en la incubación del mismo tipo de inóculo ruminal. En fermentadores RUSITEC no se tiene demasiada información sobre qué ocurre con las comunidades microbianas ruminales, aunque sí que es conocido que se produce un acusado descenso en el número de protozoos o su desaparición, tanto en los fermentadores de flujo continuo como en los fermentadores RUSITEC (Carro *et al.*, 1995, Mansfield *et al.*, 1995; Moumen *et al.*, 2007; Muetzel *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2010a, 2011a). Esta rápida desaparición de los protozoos se debe probablemente a su lenta velocidad de crecimiento (Czerkawski y Breckenridge, 1977; Mansfield *et al.*, 1995) y a la exposición de los fermentadores al oxígeno (Abe e Iriki, 1978; Hillman *et al.*, 1991; Mansfield *et al.*, 1995). También está documentada la retención de los protozoos entre la masa sólida de la digesta (Nakamura y Kurihara, 1978), y por tanto una reducción en el tiempo de retención del sólido en fermentadores continuos conlleva un marcado descenso de las comunidades protozoarias (Crawford *et al.*, 1980a).

Los fermentadores de flujo continuo y los fermentadores RUSITEC presentan varias diferencias funcionales, tales como la tasa de dilución, el tiempo de retención del sólido, la cantidad de alimento suministrado o la frecuencia de alimentación que han demostrado afectar a las variables de fermentación (Carro *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2009, 2010b 2011b), y en consecuencia se espera que haya también diferencias en las poblaciones microbianas en ambos tipos de fermentadores. Además, las poblaciones microbianas también varían con los cambios en la composición de alimentación, y las condiciones de funcionamiento en los fermentadores pueden tener una influencia variable en el desarrollo microbiano cuando se incuban diferentes dietas.

A pesar del uso extendido de ambos tipos de fermentadores, no existe una estandarización en cuanto al manejo entre los dos sistemas (Carro *et al.*, 2009). Cuando se inocula un fermentador, los microorganismos ruminales tienen que

adaptarse a las nuevas condiciones presentes en el sistema *in vitro*. A lo largo del periodo de incubación, y mayoritariamente en los primeros días, se producen cambios en las comunidades microbianas relacionadas con esta adaptación (Slyter y Putnam, 1967; Prevot *et al.*, 1994). En la bibliografía los diferentes autores han utilizado periodos de adaptación variables desde 5 hasta 11 días (Czerkawski y Breckenridge, 1977, 1979; Carro y Miller, 1999; Carro *et al.*, 1999; Godoy y Meschy, 2001; Ranilla y Carro, 2003; Jalc *et al.*, 2006; Giraldo *et al.*, 2007; Carro *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2011b; Soto *et al.*, 2012). La tasa de dilución de la fase líquida y el tiempo de retención de la sólida en fermentadores RUSITEC pueden afectar al número de días necesarios para permitir la adaptación al sistema, puesto que una mayor tasa de dilución dificulta el desarrollo de microorganismos de lenta multiplicación y si se reduce el tiempo de retención del sólido se puede alterar la colonización del substrato por parte de microorganismos de menor ritmo de crecimiento. Una vez adaptado el sistema se alcanza lo que se denomina estado estacionario entendiendo este como aquel momento en el que la salida diaria de productos de fermentación (AGV, NH₃ y lactato) no varía de forma significativa durante varios días consecutivos (Martínez *et al.*, 2011b). Czerkawski y Breckenridge (1977, 1979) indicaron que cuando el RUSITEC recibe dietas de alta calidad, el sistema logra alcanzar el estado estacionario en 4 a 6 días, mientras que si la dieta era de baja calidad este periodo aumentaba. Martínez *et al.* (2011b) determinaron que este estado se consigue a los 6 días de empezar la incubación.

2.4 Comparación *in vivo-in vitro*

2.4.1 Comparación de parámetros fermentativos y de poblaciones microbianas

Un sistema de simulación de la fermentación no puede imitar la fermentación ruminal *in vivo* en todos sus aspectos (Muetzel *et al.*, 2009), pero si se puede perfeccionar su capacidad para reproducirlos. Para validar un sistema de

fermentación *in vitro* y utilizarlo como un modelo de la fermentación ruminal, se requieren trabajos que comparen de forma directa los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* (Mansfield *et al.*, 1995). Los estudios que muestran comparaciones directas *in vivo* - *in vitro* son escasos y han sido realizados fundamentalmente en ganado vacuno y utilizando sistemas de tipo continuo.

Algunos de los trabajos que comparan la fermentación ruminal *in vitro* con lo que ocurre *in vivo* se muestran en la Tabla 2.1. Hannah *et al.* 1986 observaron que los valores de degradabilidad de la proteína y de los aminoácidos eran comparables entre un cultivo de fermentadores de doble flujo continuo e *in vivo* en ganado vacuno. Un estudio (Mansfield *et al.* 1995) comparando el mismo sistema con vacuno mostró valores similares de la digestión de la MS y de la MO, pero una menor digestión de la FND en los fermentadores y en estos una mayor concentración de AGV que *in vivo*, lo cual coincide con lo observado con Devant *et al.*, 2001. Tafaj, *et al.*, 2005 observaron una correlación lineal positiva entre producción de gas *in vitro* y concentración de AGV en CNRMR 2 h después de la incubación y alimentación *in vivo* en ganado vacuno. Bhatta *et al.*, 2007 compararon una técnica de medida de producción de metano *in vivo* en vacuno con el metano producido en fermentadores RUSITEC y en CNRMR observando menos gas estimado por RUSITEC que *in vivo*, siendo la estimación de los CNRMR muy próxima a lo observado *in vivo*. Strobel *et al.*, 2008 compararon la abundancia de bacterias y arqueas en fermentadores RUSITEC con valores encontrados en la literatura encontrando comparables esos valores *in vitro* - *in vivo*. Un trabajo que comparaba *in vivo* en ganado ovino, RUSITEC y fermentadores de flujo continuo comprobó que detectaban las mismas diferencias en pH, digestibilidad de la MS y eficiencia de crecimiento microbiano, pero hubo diferencias en la digestibilidad de FND *in vivo* que no fueron detectadas por ninguno de los dos tipos de fermentadores (Carro *et al.*, 2009). Di Marco *et al.*, (2009) observaron que la digestibilidad de la materia seca era sobreestimada *in*

in vitro tras 48 h de incubación, pero la predijo con exactitud a las 24 horas frente a lo que ocurría *in vivo* en ganado ovino y vacuno. En un estudio similar, Stalker *et al.*, (2013) en CNRMR y ganado vacuno, encuentran que la técnica *in vitro* subestima el valor de digestibilidad de la FND a las 24 horas. Muetzel *et al.* 2009 compararon un sistema estratificado de incubación ruminal con lo que ocurre *in vivo* en ganado vacuno y observaron cambios importantes en la estructura de las comunidades microbianas *in vitro* con respecto a lo observado en los animales. Un experimento (Norman *et al.* 2010) realizado para comparar la digestibilidad de la MO en ganado ovino *in vivo*, la técnica in sacco y CNRMR mostró muy buena correlación entre *in vitro* e *in vivo* y en 72 h la digestibilidad in sacco fue precisa. Otro trabajo (Pelve *et al.*, 2012) que comparó una medida de la digestibilidad *in vitro* de la MO durante 96 h con lo que ocurrió *in vivo* en ganado vacuno demostró que es posible utilizar esta técnica para estimar la digestibilidad de la misma. Tahir *et al.*, 2013 observaron que los CNRMR no detectaron tantas diferencias en la digestibilidad de la FND entre substratos como las observadas *in vivo* en ganado vacuno. Finalmente, Hatew *et al.*, 2015 estudiaron la producción de metano en ganado vacuno y en CNRMR y vieron una buena correlación cuando se expresaba la producción de metano en relación a la MO fermentable en rumen.

Tabla 2.1 Trabajos que comparan la fermentación ruminal *in vitro* vs. *in vivo*

Título	Especie / Sistema <i>in vitro</i>	Parámetros comparados	Conclusión
Evaluation of a dual flow continuous culture system for estimating bacterial fermentation <i>in vivo</i> of mixed diets containing various soybean products. (Hannah <i>et al.</i> , 1986)	Vacuno / Fermentador de flujo continuo	-Degradabilidad de la proteína y de los aminoácidos -Proporciones de acético	-Valores comparables -Valores similares
Comparison of microbial fermentation in the rumen of dairy cows and dual flow continuous-culture. (Mansfield <i>et al.</i> , 1995)	Vacuno / Fermentador de flujo continuo	-Digestión de la materia orgánica y de la materia seca -Digestión de los carbohidratos no estructurales -Digestión de la FND -Concentración de AGV	-Valores similares -Mayor en los fermentadores -Menor en los fermentadores -Mayor en los fermentadores
Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> . (Devant <i>et al.</i> , 2001)	Vacuno / Fermentadores de flujo continuo	-Concentración de AGV -Nitrógeno amoniacal -Degradabilidad de la proteína	-Mayor en cultivos continuos -Concentración en el efluente dentro de los rangos obtenidos <i>in vivo</i> -Valores próximos a los obtenidos <i>in situ</i>
Site and extent of starch degradation in the dairy cow – a comparison between <i>in vivo</i> , <i>in situ</i> and <i>in vitro</i> measurements. (Hindle <i>et al.</i> , 2005)	Vacuno / <i>in situ</i> / CNRMR	-Degradación de almidón	-Discrepancia entre lo medido <i>in vivo</i> y lo estimado <i>in situ</i> e <i>in vitro</i> .

Effects of particle size of a total mixed ration on <i>in vivo</i> ruminal fermentation patterns and inocula characteristics used for <i>in vitro</i> gas production. (Tafaj <i>et al.</i> , 2005)	Vacuno / CNRMR	-Ácidos grasos volátiles (AGV), tiamina y producción de gas <i>in vitro</i> .	-Correlación lineal positiva entre producción de gas <i>in vitro</i> y concentración de AGV y tiamina.
Comparison of <i>In vivo</i> and <i>In vitro</i> Techniques for Methane Production from Ruminant Diets. (Bhatta <i>et al.</i> , 2007)	Vacuno / RUSITEC / CNRMR	-Producción de metano	-Menos gas estimado por RUSITEC que <i>in vivo</i> . Pero el gas estimado por el sistema CNRMR fue muy parecido al medido <i>in vivo</i> .
Diversity of responses of rumen microbial communities to <i>Fusarium</i> contaminated feed, evaluated with rumen simulating technology (RUSITEC). (Strobel <i>et al.</i> , 2008)	Valores literatura/ RUSITEC	-Abundancia de bacterias y arqueas	-Comparables <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i> .
Comparison of microbial fermentation of high- and low-forage diets in RUSITEC, single-flow continuous-culture fermenters and sheep rumen. (Carro <i>et al.</i> , 2009)	Ovino / RUSITEC y fermentadores de flujo continuo	-pH, digestibilidad de la MS, eficiencia de crecimiento -Acetato:Propionato -Digestibilidad de la FND	-Detectan las mismas diferencias. -Valores más altos en RUSITEC -Existieron diferencias entre dietas <i>in vivo</i> , pero estas no fueron detectadas <i>in vitro</i> .

<p>Digestibility of forage silages from grain, sweet and bmr sorghum types: Comparison of <i>in vivo</i>, <i>in situ</i> and <i>in vitro</i> data. (Di Marco <i>et al.</i>, 2009)</p>	<p>Ovino y vacuno / digestibilidad <i>in vitro</i> en ankom Daisy</p>	<p>-Digestibilidad de la materia seca -Digestibilidad de la FND</p>	<p>-La técnica <i>in vitro</i> sobreestima este parámetro en incubación de 48 h, pero lo predice con exactitud a las 24 h. -La técnica <i>in vitro</i> subestima este valor</p>
<p>Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. (Muetzel <i>et al.</i>, 2009)</p>	<p>Vacuno / Sistema continuo estratificado de incubación ruminal</p>	<p>-Estructura de las comunidades microbianas</p>	<p>-Cambios importantes <i>in vitro</i> respecto <i>in vivo</i>.</p>
<p>Comparison of <i>in vivo</i> organic matter digestion of native Australian shrubs by sheep to <i>in vitro</i> and <i>in sacco</i> predictions. (Norman <i>et al.</i>, 2010)</p>	<p>Ovino / <i>in situ</i> / CNRMR</p>	<p>-Digestibilidad de la MO</p>	<p>-Muy buena correlación entre <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>. -En 72 h la digestibilidad <i>in sacco</i> fue precisa.</p>
<p><i>In vivo</i> and <i>in vitro</i> digestibility, nitrogen balance and methane production in non-lactating cows and heifers fed forage harvested from heterogeneous semi-natural pastures. (Pelve <i>et al.</i>, 2012)</p>	<p>Vacuno / Método de la digestibilidad <i>in vitro</i> de la MO (96 h)</p>	<p>-Digestibilidad de la MO</p>	<p>-Es posible utilizar el método de digestibilidad <i>in vitro</i> para estimar la digestibilidad de la MO <i>in vivo</i>.</p>
<p>Inclusion of forage standards with known <i>in vivo</i> digestibility in <i>in vitro</i> procedures. (Stalker <i>et al.</i>, 2013)</p>	<p>Vacuno / CNRMR</p>	<p>-Digestibilidad de la MS</p>	<p>-Los valores de digestibilidad obtenidos <i>in vitro</i> son mayores</p>

Capítulo 2

<p><i>In vitro</i> estimations of the rate and extent of ruminal digestion of starch-rich feed fractions compared to <i>in vivo</i> data. (Tahir <i>et al.</i>, 2013)</p>	<p>Vacuno / CNRMR</p>	<p>-Digestibilidad de la FND</p>	<p>-La técnica <i>in vitro</i> detecta menos diferencias entre substratos.</p>
<p>Relationship between <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> methane production measured simultaneously with different dietary starch sources and starch levels in dairy cattle. (Hatew <i>et al.</i>, 2015)</p>	<p>Vacuno/ CNRMR</p>	<p>-Producción de metano</p>	<p>-Correlación buena entre <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i> cuando se expresa en MO estimada fermentable en rumen</p>

2.5 Técnicas moleculares como herramienta de estudio

Las técnicas basadas en el análisis de los ácidos nucleicos son de gran utilidad para el estudio del ecosistema ruminal. Hasta el desarrollo de las técnicas de biología molecular, los microorganismos ruminales solo se podían estudiar mediante técnicas de cultivos clásicas, aislamiento y recuento o caracterizándose indirectamente a través de los productos resultado de la fermentación. Además, las técnicas microbiológicas convencionales permitían el estudio de solo un número limitado de microorganismos y se han visto complementadas en la actualidad por las técnicas moleculares (Raskin *et al.*, 1997).

Los métodos moleculares se basan, principalmente, en la utilización como marcadores taxonómicos de los genes que codifican para la subunidad 16S del ribosoma en procariotas o 18S en eucariotas; aunque también se pueden utilizar otras regiones como la que se encuentra entre los genes que codifican para las subunidades 16S y 23 S en procariotas. La elección de este fragmento del genoma se debe a que tiene regiones altamente conservadas (codifican para el ribosoma bacteriano, encargado de la síntesis proteica, una función conservada en todos los seres vivos) combinadas con regiones altamente variables que son las utilizadas para la clasificación filogenética (Spiegelman *et al.*, 2005). La PCR ha sido una herramienta crucial en el desarrollo de las técnicas de caracterización microbiana independientes de los cultivos conocidas como de fingerprinting o huella genética (Smith y Osborn, 2009). Estas técnicas combinan la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) con una PCR posterior y han venido utilizándose desde principios de los años 90, permitiendo el análisis del conjunto de comunidades microbianas presentes en un determinado ecosistema. El uso combinado de la amplificación de un gen que permita una clasificación taxonómica (como es el del ribosoma 16S bacteriano) con una posterior técnica de huella genética (fingerprinting) ha permitido un estudio más profundo de la

diversidad del ecosistema microbiano presente en el rumen, en comparación con lo que permitían las técnicas de cultivo clásicas.

La PCR amplifica exponencialmente el ADN presente en una muestra mediante repetidos ciclos de desnaturalización, anillamiento de cebadores específicos y polimerización con nucleótidos con ayuda de una enzima polimerasa estable en altas temperaturas (polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus*). Como se ha indicado anteriormente, los métodos moleculares más ampliamente utilizados están basados en la PCR como paso previo al análisis de las muestras. A partir de ahí se separan los amplicones que son diferentes en función de determinadas características, inherentes a cada técnica.

La clave en la PCR es la elección de los oligonucleótidos utilizados como cebadores, que deben ser específicos de la región del genoma que se necesita amplificar. Gracias a la especificidad de los mismos es posible diseñar cebadores para amplificar según el grado de profundidad deseado en el estudio, por ejemplo, el conjunto de las bacterias, un grupo concreto de estas o una sola especie (Spiegelman *et al.*, 2005).

Estas técnicas moleculares aplicadas al estudio del ecosistema ruminal tienen una serie de limitaciones que deben ser tomadas en consideración, la primera en referencia al método de extracción de ADN elegido. La lisis de los microorganismos previa a la extracción de ADN es un paso crítico ya que las bacterias Gram- se lisan más fácilmente que las Gram+ (Fliegerova *et al.*, 2014), así que el tratamiento que no es suficiente para unas resulta excesivo para otras, pudiendo no extraerse todo el ADN de la muestra o lisar parte del mismo, y este ADN excesivamente fragmentado puede actuar como inhibidor de la PCR (von Wintzingerode *et al.*, 1997). Junto con el ADN se pueden extraer de la muestra otros compuestos indeseados que inhiban posteriormente la reacción de PCR. Por todo ello se han descrito en la literatura múltiples protocolos de extracción de

ácidos nucleicos, en función del tipo de muestra, ecosistema de procedencia y tipo de microorganismos presentes en la misma. En el caso del ecosistema ruminal se ha probado como uno de los más eficaces el descrito por Yu y Morrison (2004), que combina una lisis con un tampón y un tratamiento de homogeneización con una posterior purificación con un kit comercial, obteniéndose la mayor producción específica de ADN, en un estudio en que se evaluaron 15 métodos de extracción de ADN diferentes, en muestras liofilizadas de contenido ruminal de vacas alimentadas con heno y de ovejas en pastoreo, (Henderson *et al.*, 2013). En el estudio realizado, este método extrajo un ADN de buena calidad, en cuanto a su integridad, medida en gel de electroforesis y con buenas características para la amplificación por PCR de bacterias, protozoos ciliados, hongos y arqueas (Henderson *et al.*, 2013). Cuando se realiza una PCR convencional, el número de copias de un fragmento de ADN es desconocido. Por ello la PCR convencional no puede ser utilizada para la estimar la abundancia de un fragmento de ADN presente en una muestra (Farrelly *et al.*, 1995), sino que sólo ofrece una idea de la diversidad que existe en la misma.

En estas secuencias obtenidas por PCR las regiones más conservadas simplemente permiten diferenciar entre los reino Eukarya, Bacteria y Archaea, mientras que las regiones más variables permiten la diferenciación de género y especie (von Wintzingerode *et al.*, 1997). En un principio se probó con la subunidad 5S por ser la más pequeña y de más fácil manejo. Sin embargo, el que sea la más pequeña hace que no cuente con regiones variables suficientes para diferenciar unos microorganismos de otros. Por tanto la subunidad más utilizada es la 16S, ya que es más fácil de secuenciar que la 23S. A veces, las secuencias de las subunidades 16S o 18S no resultan suficientes para diferenciar algunos grupos, por lo que es necesaria una alternativa como el espacio intergénico entre las regiones que codifican para la subunidad 16S y 23S en bacterias.

Dependiendo de los objetivos del estudio de las comunidades microbianas que se va pretenda llevar a cabo, las técnicas moleculares utilizadas se dividen en dos grupos: aquellas empleadas para el estudio de la diversidad microbiana, basadas en la “huella genética” o métodos fingerprinting, y las que buscan evaluar la abundancia de las diferentes poblaciones microbianas, basadas en métodos cuantitativos. Las primeras son útiles para estudiar de una manera rápida la estructura y diversidad de un ecosistema (Muyzer, 1999) y consisten en una extracción de ADN seguida de amplificación de un fragmento mediante PCR y el análisis, mediante diferentes métodos, del producto de la PCR. Las segundas, permiten cuantificar además de detectar y amplificar, diferentes secuencias de ADN.

En la presente Tesis Doctoral se han utilizado dos técnicas diferentes de biología molecular: una técnica de huella genética o fingerprinting, el ARISA (análisis automatizado de la región espaciadora intergénica ribosomal), método utilizado para el análisis de la población bacteriana que proporciona estimaciones de su diversidad y composición (Fisher y Triplett, 1999) y una técnica cuantitativa, la PCR cuantitativa (qPCR), método que se desarrolló a partir de la PCR convencional pero en el que es posible cuantificar las poblaciones específicas.

2.5.1 Análisis automatizado de la región espaciadora intergénica ribosomal

(Automated ribosomal intergenic spacer analysis, ARISA)

El ARISA es un método de huella genética que permite analizar la diversidad microbiana de un ecosistema. En el caso de la presente Tesis Doctoral se ha utilizado para estimar la diversidad bacteriana en muestras de ecosistema ruminal. Partiendo de una muestra de ADN se realiza una PCR en la que el fragmento diana a amplificar es el encontrado en el genoma bacteriano entre los genes que codifican para las subunidades 16S y 23S del ribosoma (Fisher y Triplett, 1999). Es un fragmento conservado pero que varía considerablemente en

cuanto a longitud (de 50 a 1500 pares de bases, Ranjard *et al.*, 2001) y secuencia nucleotídica entre los diferentes filotipos bacterianos. Uno de los dos cebadores utilizados en la PCR se marca con fluorescencia. El producto de la PCR se somete a una electroforesis capilar en la que se separaran los diferentes fragmentos en función de la longitud y estos, gracias al marcado fluorescente, son detectados de manera automática en un analizador de fragmentos por lo que se obtienen resultados de manera rápida y relativamente sencilla (Fisher y Triplett 1999; Ranjard *et al.*, 2001).

Esta técnica de huella genética tiene la ventaja, en comparación con técnicas similares, de la sencillez, ya que no son necesarias digestiones de los productos de PCR con enzimas ni geles engorrosos de preparar. Además esta técnica muestra una mayor sensibilidad para detectar microorganismos presentes en menor cantidad en las comunidades microbianas y la electroforesis parece tener una mayor resolución para detectar la fluorescencia (Saro *et al.*, 2014).

2.5.2 PCR cuantitativa (*quantitative PCR*, qPCR)

La qPCR funciona de manera similar a la PCR convencional, con múltiples ciclos en los que el ADN es desnaturalizado, para permitir el anillamiento de los cebadores y la posterior elongación de las secuencias de ADN, aumentando de esta forma exponencialmente el número de fragmentos. La especificidad de la qPCR depende de los cebadores utilizados, pudiéndose cuantificar, por ejemplo, la población total de bacterias del rumen o la cantidad una sola especie bacteriana si se utilizan los cebadores específicos para ello. En la qPCR el aumento del número de amplicones es registrado durante el proceso mediante detección de fluorescencia. Los sistemas de marcado con fluorescencia más comúnmente utilizados son las sondas Taqman (Holland *et al.*, 1991; Livak *et al.*, 1995) y el SYBR green (Wittwer *et al.*, 1997).

La cuantificación del ADN se realiza mediante el método del “ciclo de cuantificación” (*quantification cycle*, Cq). El termociclador recoge de manera automática la medida de fluorescencia tras cada ciclo de amplificación y se registra el incremento de fluorescencia con respecto al ciclo anterior, junto con el número de ciclo resultando una curva de amplificación en la que se pueden diferenciar 4 estados: fluorescencia basal, amplificación exponencial, amplificación lineal y fase de meseta. Durante la fase exponencial de amplificación la cantidad del segmento diana amplificado es proporcional a la cantidad que había del mismo en la muestra de partida y la cantidad de fluorescencia puede asociarse con la cantidad de ADN presente en la muestra de partida mediante un valor: el ciclo umbral o ciclo de cuantificación (Cq).

Esta cuantificación puede realizarse de manera relativa o absoluta. En la cuantificación relativa los cambios en el gen de interés son expresados en relación a la cantidad de otro gen. En la cuantificación absoluta el número de copias del gen diana se cuantifica a partir de una curva estándar, mediante diluciones seriadas de una muestra en la que se encuentra el gen diana en una concentración conocida.

2.6. Referencias bibliográficas

- Aafjes, J. H. y Nijhof J. K. 1967. A simple artificial rumen giving good production of volatile fatty acids. *Br. Vet. J.*, n. 123, pp. 436-445.
- Abe, M. e Iriki, T. 1978. Effects of diet on the protozoa population in permeable continuous cultures of rumen contents. *Br J Nutr.*, n. 39, pp. 255-264.
- Abe, M. y Kumeno, F. 1973. *In vitro* simulation of rumen fermentation: apparatus and effects of dilution rate and continuous dialysis on fermentation and protozoal population. *J. Anim. Sci.*, n. 36, pp. 941-950.
- Abe, M. y Kurihara, Y. 1984. Long-term cultivation of certain rumen protozoa in a continuous fermentation system supplemented with sponge materials. *J. Appl. Bacteriol.*, n. 56, pp. 201-203.
- Abecia, L., Soto, E. C., Ramos-Morales, E. y Molina-Alcaide, E., 2014. Microbial and chemical composition of liquid-associated bacteria in goats' rumen and fermenters. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, n. 5, pp. 1001-1012.

- Adler, J. H., Dye, J. A., Boggs, D. E. y Williams, H. H. 1958. Growth of rumen microorganisms in an *in vitro* continuous-flow system on a protein free diet. *Cornell Vet.*, n. 48, pp. 53-66.
- Ammar, H., López, S., González, J. S. y Ranilla, M. J. 2004. Chemical composition and *in vitro* digestibility of some Spanish browse plant species. *J. Sci. Food. Agric.*, n. 84, pp. 197-204.
- Asplund, J. M. 1994. The influence of energy on amino acid supply and utilization in the ruminant, en: Principles of protein nutrition of ruminants. Asplund, J. M., ed. CRC Press, Boca Ratón, Florida, EEUU.
- Baker, F. y Harris, S. T. 1947. Microbial digestion in the rumen (and cecum), with special reference to the decomposition of structural cellulose. *Nutr. Abstr. Revs.*, n. 17, pp. 3.
- Beever, D. E. y Mould, F. L. 2000. Forage evaluation for efficient ruminant livestock production. In: Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. Givens, D. I., Owen, E., Axford, R. F. E., Omed, H. M. (Eds.). CAB International, Wallingford, Oxford, Reino Unido.
- Benchaar, C., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Wang, Y., Beauchemin, K. A. y McAllister, T. A., 2008. Effects of essential oils and their components on *in vitro* rumen microbial fermentation (vol 87, pg 413, 2007). *Canadian J. Anim. Sci.*, n. 2, pp. 341-341.
- Beuvink, J. y Spoelstra, S. 1992. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.*, n. 37, pp. 505-509.
- Bhatta, R., Tajima, K., Takusari, N., Higuchi, K., Enishi, O. y Kurihara, M., 2007. Comparison of *In vivo* and *In vitro* Techniques for Methane Production from Ruminant Diets. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.*, n. 7, pp. 1049-1056.
- Blanchart, G. y Vignon, B., 1984. Adaptation d'un fermenteur de type Rusitec. *Bull. Rech. INRA.*, n. 9, pp. 1-10.
- Blanchart, G., Durand, M., Barry, J. L., Bouiller-Odot, M. y Jouany, J. P. 1989. Intérêts et limites des fermenteurs à flux semi-continu de type Rusitec dans l'étude des fermentations du rumen. *Ann. Zootech.*, n. 38, pp. 285-314.
- Blümmel, M. y Ørskov, E. R. 1993. Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 40, pp. 109-119.
- Blümmel, M. y Bullerdick, P. 1997. The need to complement the *in vitro* gas measurements with residue determination from in sacco degradabilities to improve the prediction of voluntary intake of hays. *Anim Sci.*, n. 64, pp. 71-75.

- Blümmel, M., Makkar, H. P. S. y Becker, K. 1997. *In vitro* gas production: A technique revisited. *J. Anim. Physiol.* n. 77, pp. 24-34.
- Blümmel, M. 2000. Predicting the partitioning of fermentation products by combined *in vitro* gas volume and true substrate degradability measurements: opportunities and limitations. In: Proceedings of the British Society of Animal Science on Gas Production: Fermentation Kinetics for Feed Evaluation and to Assess Microbial Activity, pp. 48-58.
- Bodas, R., Lopez, S., Fernandez, M., Garcia-Gonzalez, R., Rodriguez, A. B., Wallace, R. J. y Gonzalez, J. S., 2008. *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 1-4, pp. 245-258.
- Bowie, W. C. 1962. *In vitro* studies of rumen microorganisms using a continuous-flow system. *Am. J. Vet. Res.*, n. 23, pp. 858-862.
- Bryant, M. P. y Robinson, I. M. 1968. Effects of diet, time after feeding and position sampled on numbers of viable bacteria in the bovine rumen. *J. Dairy Sci.*, n. 51, pp. 1950-1955.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. y Kamel, C., 2004. Effects of different doses of plant extracts on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.*, pp. 213-213.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Cardozo, P. W. y Kamel, C., 2005. Effects of Cinnamaldehyde and Garlic Oil on Rumen Microbial Fermentation in a Dual Flow Continuous Culture. *J. Dairy Sci.*, n. 7, pp. 2508-2516.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. y Kamel, C., 2006. Plant Extracts Affect *In vitro* Rumen Microbial Fermentation. *J. Dairy Sci.*, n. 2, pp. 761-771.
- Calsamiglia, S., Stern, M D. y Firkins, J. L. 1995. Effects of protein source on nitrogen metabolism in continuous culture and intestinal digestion *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, n. 73, pp. 1819-1827.
- Calsamiglia, S., Ferret, A., Plaixats, A. J. y Devant, M. 1999. Effect of pH and pH fluctuations on microbial fermentation in a continuous culture system. *J. Dairy Sci.*, pp. 82: 38. (Abstr.)
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L. y Ferret, A., 2007. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.*, n. 6, pp. 2580-2595.
- Cardozo, P., Calsamiglia, S., Ferret, A. y Kamel, C., 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *J. Anim. Sci.*, n. 11, pp. 2572-2579.

- Carro, M. D., Lebzien, P. y Rohr, K., 1992. Influence of Yeast Culture on the *In vitro* Fermentation (Rusitec) of Diets Containing Variable Portions of Concentrates. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 3-4, pp. 209-220.
- Carro, M. D., Lebzien, P. y Rohr, K., 1995. Effects of Pore-Size of Nylon Bags and Dilution Rate on Fermentation Parameters in a Semicontinuous Artificial Rumen. *Small Rumin. Res.*, n. 2, pp. 113-119.
- Carro, M. D., Lopez, S., Valdes, C. y Ovejero, F. J., 1999. Effect of DL-malate on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen simulation technique (RUSITEC). *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 4, pp. 279-288.
- Carro, M. D. y 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). *Br. J. Nutr.*, n. 02, pp. 149.
- Carro, M. D. y Ranilla, M. J., 2003. Effect of the addition of malate on *in vitro* rumen fermentation of cereal grains. *Br. J. Nutr.*, n. 2, pp. 181-188.
- Carro, M. D., Ranilla, M. J. y Tejido, M. L., 2005. Using an *in vitro* gas production technique to examine feed additives: Effects of correcting values for different blanks. *Anim. Feed Sci. Technol.*, pp. 173-184.
- Carro, M. D., Ranilla, M. J., Martin-Garcia, A. I. y 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*, n. 4, pp. 527-534.
- Chaudhry, A. S. y Khan, M. M. H., 2012. Impacts of different spices on *in vitro* rumen dry matter disappearance, fermentation and methane of wheat or ryegrass hay based substrates. *Livest. Sci.*, n. 1, pp. 84-90.
- Chaves, A. V., Schei, I., Wang, Y., McAllister, T. A. y Benchaar, C., 2009. Effects of carvacrol and cinnamaldehyde on microbial fermentation when added to a barley- or corn-based diet in a continuous-culture system. *Canadian J. Anim. Sci.*, n. 1, pp. 97-104.
- Cheng, K. J., C. W. Forsberg, H. Minato, J. W. Costerton. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen, en: Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. Tsuda, T., Y. Sasaki, R. Kawashima, ed. Academic Press, San Diego, California, EEUU.
- Cheng, K. y McAllister, T. A., 1997. Compartmentation in the rumen en:P. N. Hobson y C. S. Stewart, eds. Springer, Holanda.
- Chenost, M., Andrieu, J., Aufrère, J. y Demarquilly, C. 1997. Some methodological aspects for predicting whole plant maize digestibility from the "gas-test" technique. *Options Méditerranéennes series A.*, n. 34, pp. 137-141.

- Colombatto, D. y Beauchemin, K. A. 2003. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. *Can. J. Anim. Sci.*, n. 85, pp. 559-568.
- Colucci, P. E., MacLeod, G. K., Growum, W. L., McYillan, I., Barney, D. J. 1990. Digesta kinetics in sheep and cattle fed diets with different forage to concentrate ratios at high and low intakes. *J. Dairy Sci.*, n. 73, pp. 2143-2156.
- Cone, J. W., Cline-Theil, W., Malestein, A. y Klooster, A. Th. Van. 1989. Degradation of starch by incubation with rumen fluid. A comparison of different starch sources. *J. Sci. Food Agric.*, n. 49, pp. 173-183.
- Cone, J. W., Gelder, A. H., Visscher, G. J. W. y Oudshoorn, L. 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 61, pp. 113-128.
- Cone, J. W., Van Gelder, A. H. y Bachmann, H. 2000. Influence of inoculum source, dilution and storage of rumen fluid on gas production profiles. En: Gas production: fermentation kinetics for feed evaluation and to assess microbial activity, Proceedings of the EAAP Satellite Symposium on Gas Production. British Society of Animal Science (BSAS), Edimburgo, Reino Unido, pp. 74-75.
- Craig, W. M., Hong, B. J., Broderick, G. A. y Bula, R. J., 1984. *In vitro* Inoculum Enriched with Particle-Associated Microorganisms for Determining Rates of Fiber Digestion and Protein Degradation. *J. Dairy Sci.*, n. 12, pp. 2902-2909.
- Crawford, R. J., Hoover, W. H. y Knowlton, P. H. 1980a. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. I. Dry matter and fibre digestion, VFA production and protozoa numbers. *J. Anim. Sci.*, n. 51, pp. 975-985.
- Crawford, R. J., Hoover, W. H. y Junkins, L. L. 1980b. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. II. Nitrogen partition and efficiency of microbial synthesis. *J. Anim. Sci.*, n. 51, pp. 986-995.
- Czerkawski, J. W. y Breckenridge, G., 1969a. The fermentation of sugar-beet pulp and sucrose in an artificial rumen, and the effect of linseed oil fatty acids on the fermentation. *Br. J. Nutr.*, n. 01, pp. 51-67.
- Czerkawski, J. W. y Breckenridge, G., 1969b. Fermentation of various soluble carbohydrates by rumen micro-organisms with particular reference to methane production. *Br. J. Nutr.*, n. 4, pp. 925-937.
- Czerkawski, J. W. y Breckenridge, G., 1978. Use of the Rumen Simulation Technique (Rusitec) to Study the Distribution of Microbial Matter in the

- Solid and Liquid-Phases of the Reaction Mixture - Sequestration of Microorganisms. *Proceedings of the nutrition society*, n. 3, pp. A70-A70.
- Czerkawski, J. W. y Breckenridge, G., 1979. Experiments with the Long-Term Rumen Simulation Technique (Rusitec) - Response to Supplementation of Basal Rations. *Br. J. Nutr.*, n. 2, pp. 217-228.
- Czerkawski, J. W. y Breckenridge, G., 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.*, n. 03, pp. 371.
- Czerkawski, J. W., 1986. *An introduction to rumen studies*. Pergamon Press. Oxford [Oxfordshire]; Nueva York, EEUU.
- Davey, L. A., Chesseman, G. C. y Briggs, C. A. E. 1960. Evaluation of an improved artificial rumen designed for continuous control during prolonged operation. *J. Agr. Sci.*, n. 55, pp. 155-163.
- Davies, Z. S., Mason, D., Brooks, A. E., Griffith, G. W., Merry, R. J. y Theodorou, M. K. 2000. An automatic system for measuring gas production from forages incubated with 343 rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 83, pp. 205-221.
- Devant, M., Ferret, A., Calsamiglia, S., Casals, R. y Gasa, J., 2001. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied *in vivo* and *in vitro*., *J. Anim. Sci.*, n. 7, pp. 1944-1953.
- Di Marco, O. N., Ressia, M. A., Arias, S., Aello, M. S. y Arzadún, M., 2009. Digestibility of forage silages from grain, sweet and bmr sorghum types: Comparison of *in vivo*, *in situ* and *in vitro* data. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 3-4, pp. 161-168.
- Doré, J., P. H. Gouet. 1991. Microbial interactions in the rumen, en: Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. Jouany, J. P., ed. INRA Editions, París, Francia.
- Dryhurst, N., Wood, C. D. 1998 The effect of nitrogen source and concentration on *in vitro* gas production using rumen micro-organisms. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 71, pp. 131-143.
- Eun, J. S., Fellner, V. y Gumpertz, M. L., 2004. Methane production by mixed ruminal cultures incubated in dual-flow fermentors. *J. Dairy Sci.*, n. 1, pp. 112-121.
- Ewart, J. M. 1974. Continuous *in vitro* rumen systems. *Proc. Nutr. Soc.* 33 (2), pp. 125-133.
- Farrelly, V., F. Rainey, E. Stackebrandt. 1995. Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.*, n. 61, pp. 2798-2801.

- Fernandez-Rivera, S. 1997. Relationships between gas release *in vitro* and *in vivo* quality measures of tropical forages. In: *In vitro* techniques for measuring nutrient supply to ruminants. Proceedings of Occasional Meeting of the British Society of Animal Science. University of Reading, Reino Unido.
- Fondevila, M., Pérez-Espés, B. 2008. A new *in vitro* system to study the effect of liquid phase turnover and pH on microbial fermentation of concentrate diets for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 144, pp. 196-211.
- Fisher, M. M. y Triplett, E. W., 1999. Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, n. 10, pp. 4630-4636.
- Fliegerova, K., Tapio, I., Bonin, A., Mrazek, J., Callegari, M. L., Bani, P., Bayat, A., Vilkki, J., Kopečný, J., Shingfield, K. J., Boyer, F., Coissac, E., Taberlet, P. y Wallace, R. J., 2014. Effect of DNA extraction and sample preservation method on rumen bacterial population. *Anaerobe*, n. 0, pp. 80-84.
- Fraser, G. R., Chaves, A. V., Wang, Y., McAllister, T. A., Beauchemin, K. A. y Benchaar, C., 2007. Assessment of the Effects of Cinnamon Leaf Oil on Rumen Microbial Fermentation Using Two Continuous Culture Systems. American Dairy Science Association, 05/01 ISBN 0022-0302.
- Fu, C. J., Felton, E. E. D., Lehmkuhler, J. W. y Kerley, M. S. 2001. Ruminal peptide concentration required to optimize microbial growth and efficiency. *J. Anim. Sci.*, n. 79, pp. 1305-1312.
- Fuchigami, M., Senshu, T. y Horiguchi, M. 1989. A simple continuous culture system for rumen microbial digestion study and effects of defaunation and dilution rates. *J. Dairy Sci.*, n. 72, pp. 3070-3078.
- Fujisawa, H., Watanabe, K., Suma, K., Origuchi, K., Matsufuji, H., Seki, T. y Ariga, T., 2009. Antibacterial Potential of Garlic-Derived Allicin and Its Cancellation by Sulfhydryl Compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, n. 9, pp. 1948-1955.
- Garcia-Gonzalez, R., Lopez, S., Fernandez, M., Bodas, R. y Gonzalez, J. S., 2008. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 1-3, pp. 36-52.
- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H. P. S. y Becker, K., 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 3-4, pp. 261-281.
- Giraldo, L. A., Ranilla, M. J., Tejido, M. L. y Carro, M. D., 2007. Influence of exogenous fibrolytic enzymes and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters. *Br. J. Nutr.*, n. 4, pp. 753-761.

- Gizzi, G., Zanchi, T. y Dciaraffia, F. 1998. Comparison of microbiological and fermentation parameters obtained with an improved rumen *in vitro* technique with those obtained *in vivo*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 73, pp. 291-305.
- Goering, H. K. y Van Soest, P. J., 1970. Forage fiber analyses: apparatus, reagents, procedures, and some applications en: *Agriculture Handbook*. Agricultural Research Service, U.S. Dept. of Agriculture Washintong, DC, EEUU
- Godoy, S. y Meschy, F. 2001. Utilization of phytate phosphorous by rumen bacteria in a semi-continuous culture system (Rusitec) in lactating goats fed on different forage to concentrate ratios. *Reprod. Nutr. Dev.*, n. 41, pp. 259-265.
- Gómez, J. A., Tejido, M. L. y Carro, M. D. 2005. Influence of disodium malate on microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters receiving medium- and highconcentrate diets. *Br. J. Nutr.*, n. 93, pp. 479-484.
- Grant, R. J. y Mertens, D. R. 1992. Impact of *in vitro* fermentation techniques upon kinetics of fiber digestion. *J. Dairy Sci.*, n. 75, pp. 1263-1272.
- Gray, F. V., Wefler, R. A., Pilgrim, A. F. y Jones, G. B. 1962. A stringent test for the artificial rumen. *Austr. J. Agr. Res.*, n. 13, pp. 343-350.
- Griswold, K. E., Apgar, G. A., Bouton, J. y Firkins, J. L. 2003. Effects of urea infusion and ruminal degradable protein concentration on microbial growth, digestibility, and fermentation in continuous culture. *J. Anim. Sci.*, n. 81, pp. 329-336.
- Hannah, S. M., Stern, M. D. y Ehle, F. R., 1986. Evaluation of a dual flow continuous culture system for estimating bacterial fermentation *in vivo* of mixed diets containing various soya bean products. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 1, pp. 51-62.
- Hatew, B., Cone, J. W., Pellikaan, W. F., Podesta, S. C., Bannink, A., Hendriks, W. H. y 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. *Anim. Feed Sci. Technol.*, pp. 20-31.
- Harbers, L. H. y Tiflman, A. D. 1962. Continuous liquid culture of rumen microorganisms. *J. Anim. Sci.*, n. 21, pp. 575-582.
- Henderson, G., Cox, F., Kittelmann, S., Miri, V. H., Zethof, M., Noel, S. J., Waghorn, G. C. y Janssen, P. H., 2013. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. *PloS one*, n. 9, pp. e74787.
- Hervás, G., Frutos, P., Giráldez, F. J., Mora, M. J., Fernández, B. y Mantecón, Á. R., 2005. Effect of preservation on fermentative activity of rumen fluid

- inoculum for *in vitro* gas production techniques. *Anim. Feed Sci. Technol.*, pp. 107-118.
- Hillman, K., Williams A. G. y Lloyd, D. 1991. Evaluation of matrices in the rumen simulation technique (Rusitec) for the maintenance of ciliate protozoa. *Lett. Appl. Microbiol.*, n. 12, pp. 129-132.
- Hindle, V. A., Vuuren van, A. M., Klop, A., Mathijssen-Kamman, A. A., Van Gelder, A. H. y Cone, J. W., 2005. Site and extent of starch degradation in the dairy cow ? a comparison between *in vivo*, *in situ* and *in vitro* measurements. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, n. 3-6, pp. 158-165.
- Hino, T., Sugiyama, M. y Okumura, K. 1993. Maintenance of protozoa and methanogens, and fiber digestion in rumen-simulating continuous culture. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, n. 39, pp. 35-45.
- Hobson, P. N. 1965. Continous culture of some anaerobes and facultative anaerobic rumen bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, n. 38, pp. 167-173.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson y D. H. Gelfand. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *PNAS.*, n. 88, pp. 7276-7280.
- Hoover, W. H., Crooker, B. A. y Sniffen, C. J. 1976a. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.*, n. 43, pp. 528-534.
- Hoover, W. H., Knowlton, P. H., Stern, M. D. y Sniffen, C. J. 1976b. Effects of diferential solid-liquid removal rates on fermentation parameters in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.*, n. 43, pp. 535-542.
- Hoover, W. H., Crawford, R. J. Jr. y Stern, M. D. 1982. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. III. Solids retention time. *J. Anim. Sci.*, n. 54, pp. 849-854.
- Hoover, W. H., Kincaid, C. R., Varga, G. A., Thayne, W. V. y Junkins L. L. Jr. 1984. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. IV. pH and dilution rate. *J. Anim. Sci.*, n. 58, pp. 692-699.
- Hungate, R. E., 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. reviews*, n. 1, pp. 1-49.
- Hungate, R. E., Fletcher, D. W., Dougherty, R. W. y Barrentine, B. F., 1955. Microbial Activity in the Bovine Rumen: Its Measurement and Relation to Bloat. *Appl. Microbiol.*, n. 3, pp. 161-173.
- Hungate, R. E., 1966. *The rumen and its microbes*. Academic Press. Nueva York, Londres.

- Isaacson, H. R., Hinds, F. C., Bryant, M. P. y Owens, F. N. 1975. Efficiency of energy utilization by mixed rumen bacteria in continuous culture. *J. Dairy Sci.*, n. 58, pp. 1645-1659.
- Jalc, D., Potkanski, A., Szumacher-Strabel, M., Kowalczyk, J. y Cieslak, A. 2006. The effect of a forage diet and different fat sources on rumen fermentation *in vitro*. *J. Anim. Feed Sci.*, n. 15, pp. 129-132.
- Johnson, R. R. 1963. Symposium on microbial digestion in ruminants: *in vitro* fermentation techniques. *J. Anim. Sci.*, n. 22, pp. 792-800.
- Kennedy, P. M., Lowry, J. B. y Conlan, L. L., 2000. Phosphate rather than surfactant accounts for the main contribution to enhanced fibre digestibility resulting from treatment with boiling neutral detergent, *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 86, pp. 177-190.
- Klevenhusen, F., Zeitz, J. O., Duval, S., Kreuzer, M. y Soliva, C. R., 2011. Garlic oil and its principal component diallyl disulfide fail to mitigate methane, but improve digestibility in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, pp. 356-363.
- Kongmun, P., Wanapat, M., Pakdee, P. y Navanukraw, C., 2010. Effect of coconut oil and garlic powder on *in vitro* fermentation using gas production technique. *Livest. Sci.*, n. 1, pp. 38-44.
- Leedle, J. A. Z., Bryant, M. P. y Hespell, R. B. 1982. Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low- or high-forage diets. *Appl. Environ. Microbiol.*, n. 44, pp. 402-412.
- Livak, K. J., S. J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, K. Deetz. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Res.*, n. 4, pp. 357-362.
- Lowman, R. S., Theodorou, M. K. y Cuddeford, D., 2002. The effect of sample processing on gas production profiles obtained using the pressure transducer technique. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 3-4, pp. 221-237.
- Macheboeuf, D., Jestin, M., Andrieu, M. y Martin-Rosset, J. W. 1997. Prediction of the organic matter digestibility of forages in horses by the gas test method. Proceedings of the symposium on *in vitro* techniques for measuring nutrient supply to ruminants *Brit. Soc. Anim. Sci.*
- Macheboeuf, D., Morgavi, D. P., Papon, Y., Mousset, J. y Arturo-Schaan, M., 2008. Dose-response effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 1-4, pp. 335-350.
- Mackie, R. I., J. J. Theiron, F. M. C. Gilchrist y M. Ndhiovu. 1983. Processing ruminal ingesta to release bacteria attached to feed particles. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, n. 90, pp. 241-254.

- Mambrini, M. y Peyraud, J. L. 1997. Retention time of feed particles and liquids in the stomachs and intestines of dairy cows. Direct measurement and calculations based on faecal collection. *Reprod. Nutr. Dev.*, n. 37, pp. 427-442.
- Mansfield, H. R., Endres, M. I. y Stern, M. D., 1995. Comparison of microbial fermentation in the rumen of dairy cows and dual flow continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 1-2, pp. 47-66.
- Marston, H. R., 1948. The fermentation of cellulose *in vitro* by organisms from the rumen of sheep. *Bioch. J.*, n. 4, pp. 564-574.
- Martínez, M. E., Ranilla, M. J., Ramos, S., Tejido, M. L. y Carro, M. D., 2009. Effects of dilution rate and retention time of concentrate on efficiency of microbial growth, methane production, and ruminal fermentation in Rusitec fermenters. *J. Dairy Sci.*, n. 8, pp. 3930-3938.
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Ramos, S., y Carro, M.D., 2010a. Comparison of fermentation of diets of variable composition in the rumen of sheep and Rusitec fermenters: II. Protozoa Populations and Diversity of Bacterial Communities. *J. Dairy Sci.*, n. 93, pp. 3699-3712.
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Ramos, S., y Carro, M.D., 2010b. Comparison of fermentation of diets of variable composition in the rumen of sheep and Rusitec fermenters: I. Digestibility, fermentation parameters and efficiency of microbial protein synthesis. *J. Dairy Sci.*, n. 93, pp. 3684-3698.
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Ramos, S., Tejido, M.L., y Carro, M.D., 2011a. Protozoa evolution in Rusitec fermenters fed diets differing in forage:concentrate ratio and forage type. *Options Méditerranéennes Serie A*, n. 99, pp. 97-102.
- Martínez, M. E., Ranilla, M. J., Ramos, S., Tejido, M. L. y Carro, M. D., 2011b. Evolution of fermentation parameters in Rusitec fermenters operated at different dilution rates and concentrate retention times. *Options méditerranéennes*, n. 99, pp. 121-126.
- Martínez-Fernandez, G., Abecia, L., Martín-García, A. I., Ramos-Morales, E., Denman, S. E., Newbold, C. J., Molina-Alcaide, E. y Yáñez-Ruiz, D. R., 2015. Response of the rumen archaeal and bacterial populations to anti-methanogenic organosulphur compounds in continuous-culture fermenters. *FEMS microbiology ecology.*, n. 91 (8).
- Mateos, I., Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Saro, C., Kamel, C. y Carro, M. D., 2013. The influence of diet type (dairy versus intensive fattening) on the effectiveness of garlic oil and cinnamaldehyde to manipulate *in vitro*

- ruminal fermentation and methane production. *Anim. production science*, n. 4, pp. 299-307.
- Mauricio, R. M., Mould, F. L., Dhanoa, M. S., Owen, E., Channa, K. S. y Theodorou, M. K., 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 79, pp. 321-330.
- McBee, R. H., 1953. A Manometric Method for the Evaluation of the Microbial Activity of the Rumen with an Application to the Utilization of Cellulose and Hemicelluloses. *Applied microbiology*, n. 2, pp. 106-110.
- McDougall, E. I., 1948. Studies on Ruminant Saliva .1. the Composition and Output of Sheeps Saliva. *Biochemical journal*, n. 1, pp. 99-&.
- Mehrez, A. Z. y Orskov, E. R., 1977. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *J. Agric. Sci.*, n. 88, pp. 645-650.
- Meng, Q., Kerely, M. S., Ludden, P. A. y Belyea, R. L., 1999. Fermentation substrate and dilution rate interact to affect microbial growth and efficiency. *J. Anim. Sci.*, n. 77, pp. 206-214.
- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. y Schneider, W., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy of ruminant feedingstuff from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci.*, n. 93, pp. 217-222.
- Menke, K.H. y Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.*, n. 28, pp. 7-55.
- Merry, R. J., McAllan, A. B. y Smith, R. H. 1990. *In vitro* continuous culture studies on the effect of nitrogen source on rumen microbial growth and fibre digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 31, pp. 55-64.
- Min, B., Barry, T., Attwood, G. y McNabb, W., 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 1-4, pp. 3-19.
- Morgavi, D. P., Kelly, W. J., Janssen, P. H. y Attwood, G. T., 2013. Rumen microbial (meta)genomics and its application to ruminant production. *Animal*, n. Supplement s1, pp. 184-201.
- Mould, F. L., Kliem, K. E., Morgan, R. y Mauricio, R. M., 2005. *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 123-124, pp. 31-50.
- Moumen, A., Yáñez-Rúiz, D.R., Carro, M.D. y Molina-Alcaide, E., 2007. Protozoa evolution in single-flow continuous culture fermenters and

- Rusitec fermenters fed highforage diets. *Options méditerranéennes, Series A.*, pp. 303-308.
- Muetzel, S., Lawrence, P., Hoffmann, E. M. y Becker, K., 2009. Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 1-2, pp. 32-43.
- Muyzer, G., 1999. DGGE/TGGE. A method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.*, n. 2, pp. 317-322.
- Nakamura, F. y Kurihara, Y., 1978. Maintenance of a certain rumen protozoal population in a continuous *in vitro* fermentation system. *Appl. and Env. Microbiol.*, n. 35, pp. 500-506.
- Norman, H. C., Revell, D. K., Mayberry, D. E., Rintoul, A. J., Wilmot, M. G. y Masters, D. G., 2010. Comparison of *in vivo* organic matter digestion of native Australian shrubs by sheep to *in vitro* and in sacco predictions. *Small Rumin. Res.*, n. 1, pp. 69-80.
- Omed, H.M., Faza, A., Axford, R.F.E., Dewi, I. Ap. y Givens, D.I., 1998. A low tech *in vitro* procedure using faecal liquor for the estimation of digestibility of forages, *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.*, n. 59.
- Opatpatanakit, Y., Kellawya, R., Clean, I. J., Annison, G. y Kirby, A., 1994. Microbial fermentation of cereal grains *in vitro*. *Austr. J. Agric. Res.*, n. 45 pp. 1247-1263.
- Ørskov, E. R. y Ryle, M., 1990. Energy nutrition in ruminants. Elsevier Applied Sci., Londres y Nueva York.
- Payne, J.S., Hamersley, A.R., Milligan, J.C., Huntington y J.A., 2002. The effect of rumen fluid collection time on its fermentative capacity and the stability of rumen conditions in sheep fed a constant diet. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.*, n. 165.
- Pearson, R. M. y Smith J. A. B., 1943. The utilization of urea in the bovine rumen. III. Synthesis and breakdown of protein in rumen ingesta. *Biochem. J.*, n. 37, pp. 153-164.
- Pell, A. N. y Schofield, P., 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, n. 76, pp. 1063-1073.
- Pell, A.N., Pitt, R.E., Doane, P.H. y Schofield, P., 1998. The development, use and application of the gas production technique at Cornell University, USA. In: *In vitro* techniques for measuring nutrient supply to ruminants. British Society of Animal Science. Occasional Publication 22. British Society of Animal Science, Edimburgo, Reino Unido.

- Pell, A. N., Woolston, T. K., Nelson, K. E., Schofield, P. 2000. Tannins: biological activity and bacterial tolerance. In: Tannins in Livestock and Human Nutrition. Brooker, J.D. (Ed.). ACIAR, Adelaide, Australia.
- Pelve, M. E., Olsson, I., Spörndly, E. y Eriksson, T., 2012. *In vivo* and *in vitro* digestibility, nitrogen balance and methane production in non-lactating cows and heifers fed forage harvested from heterogeneous semi-natural pastures. *Livest. Sci.*, n. 1-2, pp. 48-56.
- Prevot, S., Senaud, J., Boathier, J. y Prensier, G., 1994. Variation in the composition of the ruminal bacterial microflora during the adaptation phase in an artificial fermenter (Rusitec). *Zool. Sci.*, n. 11, pp. 871-878.
- Qiu, X., Eastridge, M. L., Griswold, K. E. y Firkins, J. L., 2004. Effects of substrate, passage rate, and pH in continuous culture on flows of conjugated linoleic acid and trans C18:1. *J. Dairy Sci.*, n. 87, pp. 3473-3479.
- Quin, J. I., 1943. Studies on the alimentary tract of Merino sheep in South Africa VII. Fermentation in the forestomachs of sheep. Onderstepoort. *J. Vet. Sci.*, n. 18 pp. 91.
- Ramos, S., Tejido, M. L., Ranilla, M. J., Martínez, M. E., Saro, C. y Carro, M. D., 2009. Influence of detachment procedure and diet on recovery of solid-associated bacteria from sheep ruminal digesta and representativeness of bacterial isolates as assessed by automated ribosomal intergenic spacer analysis-polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.*, n. 11, pp. 5659-5668.
- Ranilla, M. J. y Carro, M. D., 2003. Diet and procedures used to detach particle-associated microbes from ruminal digesta influence chemical composition of microbes and estimation of microbial growth in Rusitec fermenters. *J. Anim. Sci.*, n. 2, pp. 537-544.
- Ranjard, L., Poly, F., Lata, J., Mougél, C., Thioulouse, J. y Nazaret, S., 2001. Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. *Appl. Environ. Microbiol.*, n. 10, pp. 4479-4487.
- Raskin, L., W. C. Capman, R. Sharp, L. K. Poulson, D. A. Stahl. 1997. Molecular ecology of gastrointestinal systems, en: Gastrointestinal microbiology. Mackie, R. I., B. A. White, R. Isaacson, ed. Chapman and Hall, Nueva York, EEUU.
- Richards, C. J., Pedersen, J. F., Britton, R. A., Stock, R. A. y Krehbiel, C. R., 1995. *In vitro* starch disappearance procedure modifications. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 55, pp. 35-45.
- Robinson, P. H., Campbell-Mathews, M. y Fadel, J. G., 1999. Influence of storage time and temperature on *in vitro* digestion of neutral detergent fibre at

- 48 h, and comparison to 48 h *in sacco* neutral detergent fibre digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 80, pp. 257-266.
- Rymer, C., Huntington, J. A. y Givens, D. I., 1999. Effects of inoculum preparation method and concentration, method of inoculation and pre-soaking the substrate on the gas production profile of high temperature dried grass. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 78, pp. 199-213.
- Rymer, C., Huntington, J. A., Williams, B. A. y Givens, D. I., 2005. *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 0, pp. 9-30.
- Sadet, S., Martin, C., Meunier, B. y Morgavi, D. P., 2007. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal.*, n. 1, pp. 939-944.
- Sampath, K. T., Wood, C. D. y Prasad, C. S., 1995. Effect of urea and by-products on the in-vitro fermentation of untreated and urea treated finger millet (*Eleusine coracana*) straw. *J. Sci. Food Agric.*, n. 3, pp. 323-328.
- Saro, C., Ranilla, M. J. y Carro, M. D., 2012. Postprandial changes of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets varying in type of forage as monitored by real-time PCR and automated ribosomal intergenic spacer analysis. *J. Anim. Sci.*, n. 12, pp. 4487-4494.
- Saro, C., Ranilla, M. J., Cifuentes, A., Rossello-Mora, R. y Carro, M. D., 2014. Technical note: Comparison of automated ribosomal intergenic spacer analysis and denaturing gradient gel electrophoresis to assess bacterial diversity in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.*, n. 3, pp. 1083-1088.
- Schadt, I., Hoover, W. H., Miller-Webster, T. K., Thayne, W. V. y Licitra, G., 1999. Degradation of two protein sources at three solids retention times in continuous culture. *J. Anim. Sci.*, n. 77, pp. 485-491.
- Schofield, P., 2000. Gas production methods. In: *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. CAB International, Wallingford, Oxford, Reino Unido.
- Shriver, B. J., Hoover, W. H., Sargent, J. P., Crawford, R. J. Jr. y Thayne, W. V., 1986. Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. *J. Dairy Sci.*, n. 69, pp. 413-419.
- Slyter, L. L., Nelson, W. O. y Wolin, M. J., 1964. Modifications of a Device for Maintenance of the Rumen Microbial Population in Continuous Culture. *Applied microbiology*, n. 4, pp. 374-377.
- Slyter, L. L. y Putnam, P. A., 1967. *In vivo* vs. *in vitro* continuous culture of ruminal microbial populations. *J. Anim. Sci.*, n. 26, pp. 1421-1427.

- Smith, C. J., A. M. Osborn. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (QPCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* n. 67, pp. 6-20.
- Soto, E. C., Molina-Alcaide, E., Khelil, H. y Yáñez-Ruiz, D. R., 2013. Ruminal microbiota developing in different *in vitro* simulation systems inoculated with goats' rumen liquor. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 1-2, pp. 9-18.
- Soto, E. C., Yáñez-Ruiz, D. R., Cantalapiedra-Hijar, G., Vivas, A. y Molina-Alcaide, E., 2012. Changes in ruminal microbiota due to rumen content processing and incubation in single-flow continuous-culture fermenters. *Animal production science*, n. 9, pp. 813-822.
- Spiegelman, D., G. Whissell, C. W. Greer. 2005. A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Can. J. Microbiol.*, n. 51, pp. 355-386.
- Stalker, L. A., Lorenz, B. G., Ahern, N. A. y Klopfenstein, T. J., 2013. Inclusion of forage standards with known *in vivo* digestibility in *in vitro* procedures. *Livest. Sci.*, n. 2-3, pp. 198-202.
- Steingass, H. y Menke, K., 1986. Schätzung des energetischen futterwertes aus der *in vitro* mit pansen-saft bestimmten gasbildung und der chemischen Analyse. 1. Untersuchungen zur methode. *Tierernährung.*, n. 14, pp. 251-270.
- Stern, M. D. y Hoover, W. H., 1979. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: a review. *J. Anim. Sci.*, n. 49, pp. 1590-1603.
- Stern, M. D., Bach, A. y Calsamiglia, S., 2006. New concepts in protein nutrition of ruminants. In: Proc. 21st Annual Southwest Nutrition and Management Conf., Tempe, AZ. Universidad de Arizona, AZ, EEUU.
- Stevenson, A., Buchanan, C. J., Abia, R. y Eastwood, M. A., 1997. A simple *in vitro* fermentation system for polysaccharides: the effects of fermenter fluid surface area/fluid volume ratio and amount of substrate. *J. Sci. Food Agric.*, n. 73, pp. 101-105.
- Strobel, E., Seeling, K. y Tebbe, C. C., 2008. Diversity responses of rumen microbial communities to Fusarium-contaminated feed, evaluated with rumen simulating technology. *Environmental microbiology*, n. 2, pp. 483-496.
- Tafaj, M., Zebeli, Q., Junck, B., Steingass, H. y Drochner, W., 2005. Effects of particle size of a total mixed ration on *in vivo* ruminal fermentation patterns and inocula characteristics used for *in vitro* gas production. *Anim. Feed Sci. Technol.*, pp. 139-154.
- Tagliapietra, F., Cattani, M., Guadagnin, M., Haddi, M. L., Sulas, L., Muresu, R., Squartini, A., Schiavon, S. y Bailoni, L., 2014. Associative effects of poor-

- quality forages combined with food industry byproducts determined *in vitro* with an automated gas-production system. *Animal production science*.
- Tahir, M. N., Hetta, M., Larsen, M., Lund, P. y Huhtanen, P., 2013. *In vitro* estimations of the rate and extent of ruminal digestion of starch-rich feed fractions compared to *in vivo* data. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 1-4, pp. 36-45.
- Tappeiner, G., 1882. Vergleichende untersuchung der darmgase. *Zeitschrift für Physiologische Chemie.*, n. 6, pp. 432-479.
- Teather, R. M. y F. D. Sauer., 1988. A naturally compartmented rumen simulation system for the continuous culture of rumen bacteria and protozoa. *J. Dairy Sci.*, n. 71, pp. 666-673.
- Tekippe, J. A., Hristov, A. N., Heyler, K. S., Zheljazkov, V. D., Ferreira, J. F. S., Cantrell, C. L. y Varga, G. A., 2012. Effects of plants and essential oils on ruminal *in vitro* batch culture methane production and fermentation. *Canadian J. Anim. Sci.*, n. 3, pp. 395-408.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., Meallan, A. B. y France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Sci. Technol.*, n. 48, pp.185-197.
- Trei, J. E., Singh, Y. K. y Scott, G. C., 1970. Effect of methane inhibitors on rumen metabolism. *J. Anim. Sci.* 31: 256. Van Soest, P. J., 1994. *Nutritional ecology of the ruminant* / Peter J. Van Soest. Ithaca: Comstock Pub.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell University Press, Ithaca, Nueva York, EEUU.
- Warner, A. C. I., 1956. Criteria for establishing the validity of *in vitro* studies with rumen micro-organisms in so-called artificial rumen systems. *J. Gen. Microbiol.*, n. 14, pp. 733-748.
- Warner, A. C. I., 1966a. Diurnal changes in the concentrations of micro-organisms in the rumens of sheep fed limited diets once daily. *J. Gen. Microbiol.*, n. 45, pp. 213-235.
- Warner, A. C. I., 1966b. Periodic changes in the concentrations of microorganisms in the rumen of sheep fed limited diets every three hours. *J. Gen. Microbiol.*, n. 45, pp. 237-242.
- Weller, R. y Pilgrim, A. F., 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of the sheep and from a continuous *in vitro* fermentation system. *Br. J. Nutr.*, n. 32, pp. 341-351.

- Wegner, M. I., Booth, A. N., Bohstedt, G. y Hart, E. B., 1940. The *in vitro* conversion of inorganic nitrogen to protein by microorganisms from cow's rumen. *J. Dairy Sci.*, n. 23, pp. 1123-1129.
- von Wintzingerode, F., U. B. Göbel, E. Stackebrandt. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, n. 21, pp. 213-229.
- Wilkins, J. R., 1974. Pressure transducer method for measuring gas production by microorganisms. *Appl. Microbiol.*, n. 27, pp. 135-140.
- Williams, B. A., 2000. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: Forage evaluation in ruminant nutrition. Givens, D. I., Owen, E., Axford, R. F. E., Omed, H. M. (Eds.). CAB International, Wallingford, Oxford, Reino Unido.
- Williams, B. A., Tamminga, S. y Verstegen, M. W. A., 2000. Fermentation kinetics to assess microbial activity of gastro-intestinal microflora. In: Proceedings of an EAAP Satellite Symposium. Gas Production: Fermentation Kinetics for Feed Evaluation and to Assess Microbial Activity. British Society of Animal Science.
- Wittwer, C. T., M. G. Herrmann, A. A. Moss y R. P. Rasmussen., 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques.*, n. 22, pp. 130-138.
- Wolin, M. J., 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.*, n. 43, pp. 1452-1459.
- Wood, T. M. y Bhat, K. M. 1988. Methods for measuring cellulose activities. *Methods Enzymol.*, n. 160, pp. 87-112.
- Woodman, H. E. y Evans, R. E., 1938. The mechanism of cellulose digestion in the ruminant organism. IV. Further observations from *in vitro* studies of the behavior of rumen bacteria and their bearing on the problem of the nutritive value of cellulose. *J. Agr. Sci.*, n. 28, pp. 43-63.
- Yu, Z. y Morrison, M., 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques*, n. 5, pp. 808-812.
- Ziemer, C. J., Sharp, R., Stern, M. D., Cotta, M. A., Whitehead, T. R. y Stahl, D. A., 2000. Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S ribosomal RNA-targeted probes. *Environ. Microbiol.*, n. 2, pp. 632-643.

Capítulo 3. Material y métodos

3.1 Animales experimentales

A lo largo de todos los experimentos se dispuso de seis ovejas raza merina, todas ellas provistas de una cánula ruminal permanente. La colocación de la cánula se llevó a cabo mediante la técnica de la incisión descrita por Komarek (1981). Los animales no recibieron alimento durante las 24 horas previas a la intervención quirúrgica y estuvieron privados de agua durante 12 horas antes de la operación. El tratamiento postoperatorio consistió en un antibiótico de amplio espectro durante 7 días, limpiándose la zona intervenida diariamente con agua templada y yodo diluido. Las ovejas fueron manejadas de acuerdo con el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia de España y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de León.

Durante el periodo experimental las seis ovejas con cánula ruminal se alojaron juntas cuando recibían la misma dieta y en diferentes rediles cuando recibían diferentes dietas. Todas ellas recibieron diariamente una dieta experimental que varió en función del estudio. En todos los casos, la dieta estaba constituida por forraje (heno de alfalfa o heno de gramíneas) y un concentrado comercial formulado para ovejas en lactación o corderos de cebo. Los animales dispusieron continuamente de agua y de un bloque de corrector vitamínico-mineral.

3.2 Pruebas *in vitro*

Las pruebas *in vitro* se llevaron a cabo en dos tipos de sistemas: cultivos no renovados de microorganismos ruminales (CNRMR) y fermentadores de flujo semicontinuo (RUSITEC).

3.2.1 Sistema de cultivos no renovados de microorganismos ruminales (CNRMR)

Las incubaciones *in vitro* en CNRMR se llevaron a cabo en viales de vidrio de 120 mL de capacidad, en los cuales se pesaron diferentes cantidades de materia seca (MS) de sustrato que se indican en las distintas pruebas. Todos los sustratos utilizados en este tipo de pruebas se molieron previamente a un tamaño de partícula de 1 mm, utilizando un molino de martillos tipo Culatti. Para las incubaciones se utilizó fluido ruminal diluido en un medio de cultivo no limitante para el crecimiento de microorganismos ruminales, en concreto, el descrito por Goering y Van Soest (1970), sin la adición de tripticasa. El contenido ruminal se extrajo de cada oveja a través de la cánula ruminal inmediatamente antes de la administración del alimento, se introdujo en termos con el fin de mantener la temperatura y evitar el contacto con el aire e inmediatamente se trasladó al laboratorio. Una vez en el laboratorio, se filtró a través de una doble capa de gasa y el líquido recogido se mezcló con el medio de cultivo en proporción 1:4 (vol:vol).

La mezcla de los componentes del medio de cultivo y la del medio de cultivo con el fluido ruminal, así como su distribución en los viales se realizó en condiciones de anaerobiosis, bajo un flujo continuo de CO₂ y a una temperatura de 39°C. Los viales se cerraron herméticamente con un tapón de caucho, se precintaron con cápsulas de aluminio y se colocaron en un incubador a 39°C.



Figura 3.1 Cultivos no renovados de microorganismos ruminales

Los viales permanecieron dentro del incubador durante un tiempo variable en función del estudio y se realizaron las medidas y recogieron las muestras que se describen a continuación:

- pH del cultivo: fue medido (pH-metro Basic 20, Crison Instruments, S.A. Alella, España) al final de la incubación, nada más abrir las botellas.

- Producción total de gas y producción de CH₄: al finalizar la incubación antes de abrir las botellas fue leída la presión, con un transducer de presión, existente en el espacio libre de cabeza de la botella y con una jeringa fue medido el volumen de gas, recogiendo a su vez una muestra del mismo en tubos vacutainer®, para el posterior análisis de metano.

- Producción de AGV y concentración en NH₃ y ácido láctico del medio: 4 mL de contenido de las botellas fueron introducidos en tubos a los que previamente se les había añadido 100 µL de ácido sulfúrico al 20% y se congelaron a -20°C.

- Desaparición del sustrato (MS y FND): el contenido de las botellas fue filtrado a través de crisoles y el residuo sólido se utilizó para calcular la MS y FND la desaparecida.

3.2.2 Sistema de fermentadores de flujo semicontinuo (RUSITEC)

Descripción del sistema

El sistema de fermentadores de flujo semicontinuo utilizado en los experimentos fue el RUSITEC (Rumen Simulation Technique, Czerkawski y Breckenridge, 1977), con algunas modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. El sistema consta de 8 fermentadores sumergidos en un baño de agua a 39°C (ver Figura 3.2). Cada fermentador está compuesto por un recipiente de plástico rígido de 600 mL de volumen, cerrado con una tapa con tres orificios. A través de uno de ellos se infunde continuamente una solución tampón (saliva artificial, McDougall, 1948) mediante una bomba peristáltica. El segundo de los orificios está conectado a una botella donde se recoge el efluente que rebosa del fermentador que su vez, está conectada a una bolsa hermética en la que se

recogen los gases producidos durante la fermentación. El tercer orificio de la tapa dispone de una válvula, a través de la cual se puede acceder directamente al fermentador para tomar muestras de su contenido.

La tapa de los fermentadores es atravesada por un eje unido a un motor que hace que mantenga un movimiento cíclico ascendente y descendente en el interior del mismo produciéndose una agitación continua del medio de fermentación facilitando que el contenido líquido del fermentador pase a través del material sólido en cada movimiento, simulando los movimientos de contracción del rumen.



Figura 3.2 Sistema de 8 fermentadores de flujo semicontinuo (RUSITEC; Rumen Simulation Technique; Czerkawski y Breckenridge, 1977)

Manejo del sistema

El primer día de la prueba experimental, cada fermentador se inoculó con contenido ruminal, tanto líquido como sólido. 250 mL de líquido ruminal se mezclaron con 200 mL de saliva artificial (Mcdougall, 1948) y con esa mezcla se llenó la vasija. Posteriormente, se introdujeron 80 g de contenido ruminal en una bolsa de nailon (100 μ m de diámetro de poro). El alimento se introdujo en dos bolsas, empapadas con la mezcla de saliva y líquido ruminal para eliminar el aire de su interior, una con el forraje y una con el concentrado, correspondientes en

cada experimento. Una vez fijadas las tres bolsas al eje rígido, el fermentador se cerró, se colocó dentro del baño de agua, y se conectaron los tubos de saliva artificial y de salida del efluente. En las botellas de recogida del efluente se añadieron 20 mL de ácido sulfúrico (20%, vol:vol) con el fin de detener el proceso fermentativo. A continuación, a cada fermentador se le suministró 2 L de nitrógeno para establecer condiciones de anaerobiosis, y se conectaron las bolsas de recogida de gas correspondientes. Finalmente, y una vez que todas las conexiones fueron confirmadas, se puso en marcha el motor del sistema.

El manejo diario de los fermentadores se describe a continuación: se apagaba el motor de agitación y cada fermentador recibía 2 L de N₂, con el fin de desplazar los gases producidos que pudieran quedar en el sistema hasta la bolsa de recogida antes de que esta fuera retirada. A continuación, se desconectaban los tubos de la saliva y del efluente, se extraía la vasija y se introducía en otro baño de agua (39°C) de menor tamaño, para poder manejar el fermentador cómodamente. Antes de abrir el fermentador, se agitaba varias veces el eje con las bolsas de alimento para homogeneizar el contenido antes de recoger las muestras. Una vez abierta la vasija, se medía el pH del contenido líquido (pHmetro Basic 20, Crison Instruments, S.A. Alella, España) y se extraían las bolsas de alimento que llevaban 48 h (forraje) y 24 h (concentrado) dentro del fermentador. La bolsa de alimento extraída se sometía a dos lavados sucesivos con contenido líquido del fermentador y el líquido procedente de estos dos lavados se empleaba para impregnar las nuevas bolsas de alimento que iban a ser introducidas. Finalmente, se cerraba el fermentador y se colocaba dentro del baño de agua.

El efluente recogido en cada botella se pesaba y se vaciaba la botella, volviendo a añadirse 20 mL de ácido sulfúrico al 20%. Una vez que todos los fermentadores y tubos eran colocados correctamente, se gaseaba cada fermentador con 2 L de nitrógeno, se conectaban las bolsas de recogida de gases y se ponía en marcha el motor.

Durante los diferentes estudios se recogieron las muestras y se realizaron las medidas que se describen a continuación:

- Volumen de gas contenido en las bolsas y concentración de metano en el mismo.

- Peso del efluente y muestras para analizar su concentración de NH_3 (2 mL), AGVs (1 mL) y lactato (1 mL). Dichas muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.

- Desaparición de MS, FND y FAD. Las bolsas de nailon con el residuo sólido de alimento no degradado se sacaron de los fermentadores, se escurrieron, se lavaron en la lavadora en programa de agua fría, y se secaron en estufa a 60°C . La desaparición de la MS se calculó por diferencia de peso con respecto a la cantidad de MS que se había introducido en el fermentador. Para calcular la desaparición de FND y FAD se realizó el análisis de FND y FAD en el residuo previamente molido.

- Muestras para el análisis de las comunidades microbianas mediante biología molecular. Se tomaron muestras de las fases sólida y líquida de la digesta: 8 mL de líquido de cada uno de los fermentadores y una muestra representativa del residuo sólido de las bolsas que contenían, respectivamente, el forraje y el concentrado. Estas muestras se almacenaron a -80°C .

- Muestras para análisis de actividad enzimática: 6 mL del contenido líquido de las vasijas y una muestra representativa del residuo sólido. Las muestras se congelaron inmediatamente a -20°C .

3.3 Procesado de las muestras y análisis químicos

3.3.1 Producción de gas y metano

La producción diaria de gas (L/d) en los fermentadores RUSITEC se midió conectando la bolsa de recogida del gas a un medidor de volumen (modelo TG1; Ritter Apparatebau GmbH, Bochum, Alemania). El volumen de gas fue corregido para las condiciones normales (1 atmósfera de presión y 273°K de temperatura)

en función de la temperatura y la presión atmosférica del momento, y se calcularon los moles de gas producidos. La concentración de CH₄ en el gas de las bolsas del RUSITEC y de las muestras de las botellas de los CNRMR se determinó utilizando un cromatógrafo de gases (Shimadzu GC 14B) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna empaquetada con Carboxen 1000 (malla 45-60; Supelco, Madrid, España). Las muestras de gas se inyectaron en el cromatógrafo por duplicado. El cálculo de la concentración de CH₄ se realizó mediante la comparación con un estándar que posee una concentración de CH₄ conocida (10%).

3.3.2 Composición química

El contenido de MS de las muestras se determinó mediante desecación a 100°C en una estufa de ventilación forzada hasta alcanzar un peso constante (AOAC, 1999). El contenido de cenizas se determinó por calcinación de las muestras en un horno de mufla a 550°C durante 12 horas, y el contenido en materia orgánica (MO) se calculó por diferencia.

El contenido de FND y FAD se analizó siguiendo la técnica secuencial descrita por Van Soest *et al.* (1991), adoptando las modificaciones propuestas por ANKOM (1998). El contenido en N se determinó mediante el método Kjeldahl (AOAC, 1999), utilizando un equipo de destilación Kjeltex System 1002 (Tecator).

3.3.3 Amoníaco

El análisis de la concentración de NH₃ en las muestras 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 (NaClO), de tal forma que se produce indofenol.

3.3.4 Ácido láctico

La determinación de la concentración de lactato se realizó según la técnica descrita por Taylor (1996) que se basa en la reacción del ácido láctico presente en

la muestra con parafenilfenol y sulfato de cobre en presencia de ácido sulfúrico y calor, produciéndose un compuesto que absorbe la luz a 570 nm.

3.3.5 Ácidos grasos volátiles

Las muestras que se recogieron para analizar su concentración de AGV se descongelaron a 4°C, y se mezclaron 0,8 mL del sobrenadante con 0,5 mL de una solución acidificante y desproteinizante (100 g de ácido metafosfórico y 0,6 g de ácido crotónico, utilizado como estándar interno, por litro de HCl). La mezcla obtenida se dejó reposar durante 12 horas en frío (4°C) y se centrifugó a 13 000 \times g durante 15 minutos a 4°C antes de proceder a su trasvase a viales de cromatografía. La concentración de los ácidos acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico y caproico se determinó mediante cromatografía de gases, en un cromatógrafo Shimadzu GC 2010 equipado con un inyector automático, un detector de ionización de llama y una columna semicapilar TR-FFAP de 30 m \times 0.53 mm \times 1 μ m (Supelco, Barcelona, España).

3.3.6 Actividad enzimática

La actividad enzimática en las muestras se determinó siguiendo los procedimientos descritos por Giraldo *et al.* (2008). Las muestras de contenido sólido (aproximadamente 10 g) se descongelaron a 4°C. Una submuestra de 2 g se utilizó para determinar el contenido en MS y el resto fue picado con tijeras. A continuación, se pesaron 3 g en una bolsa de Stomacher® y se mezclaron con 15 mL de tampón fosfato (pH = 6,5) que contenía ditioneitol (DTT; 1mM). La mezcla fue homogeneizada en un Stomacher® (Stomacher 400 Circulator, Seward Ltd., Londres, Reino Unido) a 230 revoluciones por minuto durante 5 min con el objetivo de desligar los microorganismos de las partículas de alimento. De la suspensión resultante se tomaron 1,5 mL que se trataron durante 3 min en un Mini-Beadbeater (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, Estados Unidos) para acceder a enzimas de membrana e intracelulares. Tras el tratamiento las muestras

se centrifugaron (10 000 × g; 10 min; 4°C) y en el sobrenadante se analizaron las actividades carboximetilcelulasa, xilanas y amilasa usando como sustrato carboximetilcelulosa, xilano de avena y almidón soluble respectivamente. Las muestras de líquido ruminal se descongelaron también a 4°C y se tomaron 1,5 mL que se trataron en un Mini-Beadbeater y se analizaron siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. La actividad enzimática se expresó como μ moles de glucosa o xilosa liberados del sustrato correspondiente por g de MS de contenido sólido o mL de líquido ruminal en un minuto a pH = 6,5 y 39°C.

3.3.7 Extracción y cuantificación de ADN

El ADN se extrajo de las muestras siguiendo la técnica descrita por Yu y Morrison (2004) con un paso adicional en el que las muestras se trataron con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para eliminar inhibidores de la PCR (Saro *et al.*, 2012). El DNA extraído se cuantificó por espectrometría usando un Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, DE, Estados Unidos) a una longitud de onda de 260 nm y su calidad se estimó a partir de la relación de absorbancias a 260 y 280 nm (A260/A280).

3.3.8 Análisis automatizado de la región espaciadora intergénica ribosomal (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, ARISA*)

El ADN extraído se amplificó usando los cebadores bacterianos universales 16S-1392F y 23S-123R (Danovaro *et al.*, 2006); sintetizados por Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España), que amplifican la región en el operón ITS1 del ARNr (Tabla 3.1). El cebador inverso fue marcado con el fluorocromo 6-FAM. Cada mezcla de PCR (25 μ L volumen final) contenía tampón de reacción de PCR 1x, 1,5 mM MgCl₂, 0,25 μ M de cada cebador, cada desoxinucleótido trifosfato en una concentración de 0,2 mM y 2,5 UI de Taq polimerasa (Biotools B&M Labs S.A., Madrid, España), agua miliQ y 10 ng de ADN. La reacción se inició con un ciclo de desnaturalización inicial

de 4 min a 94°C seguido de 30 ciclos de desnaturalización 1 min a 94°C, anillamiento durante 1 min a 55°C y elongación a 72°C durante 2 min, con un paso final de elongación a 72°C durante 2 min.

Tabla 3.1 Secuencias de los cebadores para el análisis automatizado de la región espaciadora intergénica ribosomal (Danovaro *et al.*, 2006)

Cebador	Secuencia
16S-1392 F	5'-GYACACACCGCCCGT-3'
23S-125 R	5'-GGGTTBCCCCATTCRG-3'

Para cada muestra, 5 ng de amplicón se mezclaron con un estándar interno de tamaño (GS 1200 LIZ, Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) en formamida desionizada, después se desnaturalizaron a 94°C durante 4 min e inmediatamente se colocaron en hielo. La detección automática de los fragmentos del ARISA se llevó a cabo usando un secuenciador ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) con un capilar de 36 cm por 50 µm y el polímero POP-7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Con el fin de incluir el máximo número de picos evitando la fluorescencia basal y así estandarizar los electroferogramas, se utilizó un umbral de 100 unidades de fluorescencia. Con el perfil de picos del electroferograma se construyó una matriz de ceros y unos y se calculó el índice de diversidad de Shannon y Weaver (1949) para cada grupo de muestras y este índice fue utilizado para evaluar la diversidad de las comunidades bacterianas. Asimismo, se construyeron dendrogramas usando el coeficiente de correlación Pearson y la opción UPGMA (Umweight pair-group method) y se realizó un análisis de componentes principales utilizando el software MVSP v3.12d (Kovach Computing Service, Anglesey, Gales, Reino Unido).

3.3.9 PCR cuantitativa (*quantitative PCR, qPCR*)

La PCR cuantitativa se utilizó para la cuantificación absoluta de bacterias y protozoos y para la cuantificación relativa de tres especies de bacterias fibrolíticas (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*), de los hongos y de las arqueas.

Las PCR se realizaron usando Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) y se analizaron en un ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 3.2.

En todos los casos el volumen de reacción fue de 20 μL , que contenían 10 μL de SBYR Green PCR Master Mix, 0,9 μL de cada cebador (20 μM), 6,20 μL de agua destilada y 20 ng de la muestra de ADN. En el caso de las bacterias, las arqueas y los hongos las condiciones de la PCR fueron: un primer paso de desnaturalización de 94°C durante 10 min y 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 s y anillamiento y elongación a 60°C durante 1 min. En el caso de los protozoos las condiciones de la PCR fueron desnaturalización a 95°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 s, anillamiento a 54°C durante 30 s y elongación a 60°C durante 1 min.

En todos los casos se realizó una curva de desnaturalización para comprobar la especificidad de los amplicones, y en cada placa se cargó una muestra de agua destilada estéril para actuar como control negativo para detectar contaminación o formación de dímeros.

Tabla 3.2 Secuencia de los cebadores para la PCR en tiempo real

Especie destino	Secuencia	Tamaño	
Bacterias totales	f-CGGCAACGAGCGCGAACCC r-CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	130	(Denman y McSweeney, 2006)
Hongos	f-GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC r CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT	120	(Denman y McSweeney, 2006)
Protozoos	f-GCTTTTCGWTGGTAGTGTATT r-CTTGCCCTCYAATCGTWCT	223	(Sylvester <i>et al.</i> , 2004)
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	f-GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA r-CGCCTGCCCTGAACTATC	121	(Denman y McSweeney, 2006)
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	f-CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG r-CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC	132	(Denman y McSweeney, 2006)
<i>Ruminococcus albus</i>	f-CCCTAAAACCAGTCTTAGTTCG r CCTCCTTGCGGTTAGAACA	176	(Koike y Kobayashi, 2001)
Arqueas metanogénicas	f-TTCGGTGGATCDCARAGRGC r-GBARGTCGWAWCCGTAGAATC	140	(Denman <i>et al.</i> , 2007)

Para la cuantificación absoluta de las bacterias totales y de protozoos se creó una curva patrón con estándares de ADN bacteriano y otra de ADN protozoario de concentración conocida. El ADN fue obtenido del rumen de las ovejas siguiendo los procedimientos descritos por Ramos *et al.* (2009) y Saro *et al.* (2012) para las bacterias y los protozoos respectivamente. La cuantificación de las bacterias fibrolíticas y de los hongos se realizó de forma relativa en función de la cuantificación absoluta de las bacterias totales según el método propuesto por Pfaffl (2001).

3.4. Referencias bibliográficas

- ANKOM, 1998. Procedures for fibre and *in vitro* analysis.
- AOAC, 1999. Official Methods of Analysis en: Assoc. Off. Anal. Chem., Gaithersburg, MD, EEUU.
- Czerkawski, J. W. y Breckenridge, G., 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.*, n. 03, pp. 371.
- Danovaro, R., Luna, G. M., Dell'Anno, A. y Pietrangeli, B., 2006. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, n. 9, pp. 5982-5989.
- Denman, S. E. y McSweeney, C. S., 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS microbiology ecology*, n. 3, pp. 572-582.
- Denman, S. E., Tomkins, N. y McSweeney, C. S., 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS microbiology ecology*, n. 3, pp. 313-322.
- Giraldo, L.A., M. J. Ranilla, M. J. Tejido, y M. D. Carro. 2008. Influence of directfed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay based diet. *J. Anim. Sci.*, n. 86, pp. 1617-1623.
- Goering, H. K. y Van Soest, P. J., 1970. Forage fiber analyses: apparatus, reagents, procedures, and some applications en: *Agriculture Handbook*. Agricultural Research Service, U.S. Dept. of Agriculture Washintong, DC, EEUU.
- Koike, S. y Kobayashi, Y., 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS microbiology letters*, n. 2, pp. 361-366.
- Komarek, R. J., 1981. Rumen and abomasal cannulation of sheep with specially designed cannulas and a cannula insertion instrument. *J. Anim. Sci.*, n. 3, pp. 790-795.
- Mcdougall, E. I., 1948. Studies on ruminant saliva 1. the composition and output of sheeps saliva. *Biochemical journal*, n. 1, pp. 99-109.
- Pfaffl, M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, n. 9, pp. e45-e45.

- Ramos, S., Tejido, M. L., Ranilla, M. J., Martínez, M. E., Saro, C. y Carro, M. D., 2009. Influence of detachment procedure and diet on recovery of solid-associated bacteria from sheep ruminal digesta and representativeness of bacterial isolates as assessed by automated ribosomal intergenic spacer analysis-polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.*, n. 11, pp. 5659-5668.
- Saro, C., Ranilla, M. J. y Carro, M. D., 2012. Postprandial changes of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets varying in type of forage as monitored by real-time PCR and automated ribosomal intergenic spacer analysis. *J. Anim. Sci.*, n. 12, pp. 4487-4494.
- Shannon, C. E. y Weaver, W., 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press. Urbana, Illinois, EEUU.
- Sylvester, J., Karnati, S., Yu, Z., Morrison, M. y Firkins, J., 2004. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. *Journal of nutrition*, n. 12, pp. 3378-3384.
- Taylor, K. C. C., 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied biochemistry and biotechnology*, n. 1, pp. 49-58.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. y Lewis, B. A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, n. 10, pp. 3583-3597.
- Weatherburn, M. W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical chemistry*, n. 8, pp. 971-974.
- Yu, Z. y Morrison, M., 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques*, n. 5, pp. 808-812.

Capítulo 4. Pruebas experimentales

4.1. Prueba 1. The influence of diet on the effectiveness of garlic oil and cinnamaldehyde to manipulate *in vitro* ruminal fermentation and methane production

The influence of diet on the effectiveness of garlic oil and cinnamaldehyde to manipulate *in vitro* ruminal fermentation and methane production

Mateos I^A., M.J. Ranilla^{A,B}, M.L. Tejido^B, C. Saro^A, C. Kamel^{A,C} and M.D.Carro^{A,B,D,E}

^ADepartamento de Producción Animal, Universidad de León, 24007 León, Spain.

^BInstituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León, Spain

^CDeceased

^DPresent address: Departamento de Producción Animal, ETSI Agrónomos, Ciudad Universitaria, s/n Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^ECorresponding author. Email: mariadolores.carro@upm.es

Animal Production Science, 2013

4.1.1 Abstract

The objective of this study was to evaluate the effects of increasing doses [0 (control: CON), 20, 60, 180 and 540 mg/L incubation medium] of garlic oil (GO) and cinnamaldehyde (CIN) on *in vitro* ruminal fermentation of two diets. Batch cultures of mixed ruminal microorganisms were inoculated with ruminal fluid from four sheep fed a medium-concentrate diet (MC; 50:50 alfalfa hay:concentrate) or four sheep fed a high-concentrate diet (HC; 15:85 barley straw:concentrate). Diets MC and HC were representative of those fed to dairy and fattening ruminants, respectively. Samples of each diet were used as incubation substrates for the corresponding inoculum, and the incubation was repeated on 4 different days (four replicates per experimental treatment). There were GO × diet- type and CIN × diet- type interactions ($P < 0.001$ – 0.05) for many of the parameters determined, indicating different effects of both oils depending on the diet type. In general, effects of GO were more pronounced for MC compared with HC diet. Supplementation of GO did not affect ($P > 0.05$) total volatile fatty acid (VFA) production at any dose. For MC diet, GO at 60, 180 and 540 mg/L decreased ($P < 0.05$) molar proportion of acetate (608, 569 and 547 mmol/mol total VFA, respectively), and increased ($P < 0.05$) propionate proportion (233, 256 and 268 mmol/mol total VFA, respectively), compared with CON values (629 and 215 mmol/mol total VFA for acetate and propionate, respectively). A minimum dose of 180 mg of GO/L was required to produce similar modifications in acetate and propionate proportions with HC diet, but no effects ($P > 0.05$) on butyrate proportion were detected. Methane/VFA ratio was reduced ($P < 0.05$) by GO at 60, 180 and 540 mg/L for MC diet (0.23, 0.16 and 0.10 mol/mol, respectively), and by GO at 20, 60, 180 and 540 mg/L for HC diet (0.19, 0.19, 0.16 and 0.08 mol/mol, respectively), compared with CON (0.26 and 0.21 mol/mol for MC and HC diets, respectively). No effects ($P = 0.16$ – 0.85) of GO on final pH and concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ and lactate were detected. For both diet

types, the highest CIN dose decreased ($P < 0.05$) production of total VFA, gas and methane, which would indicate an inhibition of fermentation. Compared with CON, CIN at 180 mg/L increased ($P < 0.05$) acetate proportion for the MC (629 and 644 mmol/mol total VFA for CON and CIN, respectively), and HC (525 and 540 mmol/mol total VFA, respectively), diets, without affecting the proportions of any other VFA or total VFA production. Whereas for MC diet CIN at 60 and 180 mg/L decreased ($P < 0.05$) $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations compared with CON, only a trend ($P < 0.10$) was observed for CIN at 180 mg/L with the HC diet. Supplementation of CIN up to 180 mg/L did not affect ($P = 0.1875\text{--}0.9989$) lactate concentrations and production of gas and methane for any diet. The results show that effectiveness of GO and CIN to modify ruminal fermentation may depend on diet type, which would have practical implications if they are confirmed *in vivo*.

4.1.2 Introduction

Identification of substances that modify rumen fermentation to increase its efficiency and decrease the amount of methane and nitrogenous pollution excreted into the environment is an important objective of current ruminant nutrition research. In the last years, the potential of a wide range of plant extracts as additives to manipulate ruminal fermentation has been extensively investigated using *in vitro* systems, but garlic oil (GO) and cinnamaldehyde (CIN) are two of the most cited extracts in the literature (Calsamiglia *et al.* 2007). Research on GO and CIN has produced, however, controversial results. In *in vitro* experiments GO and some of its compounds have been repeatedly shown to reduce the proportions of acetate and to increase those of propionate and butyrate (Busquet *et al.* 2005a; Calsamiglia *et al.* 2007), but their effects on N metabolism and methane are more variable (Busquet *et al.* 2005b; Kamel *et al.* 2008; Kongmum *et al.* 2010). Cinnamaldehyde is the main active component of cinnamon oil, and it has been investigated because of its potential to modify N

metabolism, although the results found both *in vitro* (Busquet et al., 2005a,b,c; Cardozo et al. 2004; Busquet et al. 2005a, 2005b, 2005c; Benchaar et al. 2007) and *in vivo* (Chaves et al. 2008; Yang et al. 2010) are inconsistent. The contrasting results observed when using GO and CIN as additives to manipulate rumen fermentation could be due to many factors, including, among others, extract characteristics and dose, ruminal pH, microbial populations, and diet fed to animals or used as substrate for *in vitro* incubations. The effects of different doses of GO and CIN and of ruminal pH have been previously investigated, but to our knowledge no study has specifically addressed the influence of the diet type on the effectiveness of GO and CIN, despite the fact the diet is one of the most relevant factors affecting ruminal microbial populations (Weimer et al. 1999). Our hypothesis was that the effective dose and the effects of GO and CIN on *in vitro* ruminal fermentation would depend on microbial populations in the inoculum, and therefore on the type of diet fed to the host animal. This study was designed to evaluate the effects of increasing doses of GO and CIN on *in vitro* ruminal fermentation as influenced by the type of diet (i.e. dairy versus fattening), and therefore the tested diets were both fed to donor animals and incubated *in vitro*.

4.1.3 Materials and Methods

4.1.3.1 Animals and diets

Eight rumen-cannulated Merino sheep were used as ruminal fluid donors for the *in vitro* incubations. Four sheep were fed a 50 : 50 alfalfa hay : concentrate diet (medium-concentrate diet; MC) and the other four received a 15 : 85 barley straw : concentrate diet (high-concentrate; HC). Diets were formulated to be representative of those fed to dairy animals (MC) and to growing ruminants under intensive systems of production (HC). Ingredient and chemical composition of both diets are shown in Table 4.1.1. Both diets were fed in two equal portions at 0900 and 1800 hours. Sheep were managed according to

protocols approved by the León University Institutional Animal Care and Use Committee, and were adapted to the corresponding diet for 2 weeks before starting the *in vitro* incubations.

Table 4.1.1 Ingredient composition and chemical analysis of medium- (MC) and high-concentrate (HC) diets fed to donor sheep and used as substrates for the *in vitro* fermentations

Ingredient (g/kg of DM)	Diet	
	MC	HC
Alfalfa hay	500	–
Barley straw	–	150
Barley	199	425
Corn	96.0	255
Soybean meal	71.0	150
Lupin	60.0	–
Oat	31.5	–
Fullfat soybean	15.0	–
Calcium carbonate	6.9	6.7
Sugarcane molasses	5.0	–
NaCl	3.5	3.7
Dicalcium phosphate	2.1	–
Mineral/vitamin premix ^A	10.0	10.0
<i>Chemical analyses (g/kg of DM)</i>		
Organic matter	935	942
Crude protein	186	150
Neutral detergent fibre	394	357
Acid detergent fibre	179	126

^ADeclared composition (g/kg mineral/vitamin premix): vitamin A, 600 000 IU; vitamin D₃, 120 000 IU; vitamin E, 1 g; vitamin B₁, 33 mg; niacine, 1.5 g; S, 5 g; IK, 300 mg; SO₄Fe, 1 g; ZnO, 4 g; MnO, 2 g; CoSO₄, 60 mg; Na₂SeO₃, 30 mg; Ethoxyquin, 30 mg.

4.1.3.2 Substrates, additives and *in vitro* fermentations

Samples of the two diets fed to sheep were used as substrates for the *in vitro* fermentations. Forages and concentrates were ground through a 1- mm screen and mixed in the corresponding proportions. The two additives were supplied by Axiss France SAS (Bellegarde Sur Valserine, France). Based on previous analysis GO contained 0.65 g of diallyl disulfide, 0.15 g of diallyl trisulfide and 0.10 g of allicin per g of oil, and CIN had a 99% purity. The concentrations of each additive used were selected from previous studies (Busquet et al. 2005b; Kamel et al. 2008) and were: 0 (control: CON), 20 (GO20 and CIN20), 60 (GO60 and CIN60), 180 (GO180 and CIN180) and 540 (GO540 and CIN540) mg/L incubation medium, representing 0, 0.2, 0.6, 1.8 and 5.4 g/kg of the incubated substrate, respectively. Samples of substrates (300 mg DM) were weighed into 120 mL serum bottles. Additives were dissolved in ethanol the day of the incubation, and 30 μ L of the corresponding solution were applied inside the bottles immediately before adding buffered rumen fluid. Control bottles received 30 μ L of ethanol.

Ruminal contents were obtained immediately before the morning feeding from each sheep, mixed by diet (four sheep per diet), and strained through four layers of cheesecloth into an Erlenmeyer flask with an O₂-free headspace. Particle-free fluid was mixed with the buffer solution of Goering and Van Soest (1970; no trypticase added) in a proportion 1:4 (vol/vol) at 39°C under continuous flushing with CO₂.

A total of nine bottles with each substrate (one bottle per substrate and additive dose) and six bottles without substrate (blanks) were incubated. Thirty mL of buffered rumen fluid were added into each bottle under CO₂ flushing. Bottles of each substrate were filled with buffered ruminal fluid from sheep fed the same diet. Bottles were sealed with rubber stoppers and aluminium caps, incubated at 39°C, and withdrawn 16 h after inoculation (corresponding to a passage rate from the rumen of 0.06 per h). Total gas production was measured

using a pressure transducer and a calibrated syringe, and a gas sample (10 mL) was removed from each bottle and stored in a Haemoguard Vacutainer (Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium) before analysis for methane. Bottles were then uncapped, the pH was measured immediately with a pH meter, and the fermentation was slower down by swirling the bottles in ice. One mL of content was added to 1 mL of deproteinising solution [i.e. metaphosphoric acid (20 g/L) and crotonic acid (4 g/L)] for volatile fatty acid (VFA) determination, 1 mL was added to 1 mL 0.5 M HCl for NH₃-N analysis, and 1 mL was immediately frozen for lactate analysis. The experiment was repeated on four non-consecutive days to get four bottles per experimental treatment.

4.1.3.3 Analytical procedures

Dry matter (ID 934.01), ash (ID 942.05) and N (ID 984.13) were determined according to the Association of Official Analytical Chemists (1999). Neutral detergent fibre with heat-stable amylase and expressed inclusive of residual ash (NDF) and acid detergent fibre acid detergent fibre expressed inclusive of residual ash (ADF) analyses were carried out according to Van Soest et al. (1991) using an ANKOM²²⁰ Fibre Analyser unit (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA). Sodium sulfite and heat-stable amylase were used in analysis of NDF and ADF, and they were expressed inclusive of residual ash. Concentrations of VFA, NH₃-N and total lactate were determined as described by García-Martínez et al. (2005), and methane was analysed by gas chromatography following the procedure described by Martínez et al. (2010).

4.1.3.4 Calculations and statistical analyses

The amounts of VFA produced in each bottle were calculated by subtracting the amount present initially in the incubation medium from that determined at the end of the incubation period. The volume of gas produced was corrected for temperature (273 K) and pressure (1.013×10^5 Pa), and the amount of methane

(mmol) was calculated by multiplying gas produced by the concentration of methane in the analysed sample. The gas produced was calculated as the sum of the gas measured plus the gas in the head space of the cultures. Recovery of hydrogen in each bottle was estimated from net productions of acetate, propionate, butyrate, valerate and methane (Demeyer 1991), and the amount of organic matter apparently fermented (AFOM) was estimated from VFA production using the equation proposed by Demeyer and Van Nevel (1975).

Differences between the two inocula were assessed by ANOVA with inoculum and inoculum \times incubation day as fixed effects and incubation day as a random effect. *In vitro* data were analysed separately for each additive. Five concentrations of additive (0, 20, 60, 180 and 540 mg/L), two diets (MC and HC), and the interaction of additive dose \times diet type were included in the model as fixed effects, whereas incubation day was considered as a random effect. Nonorthogonal polynomial contrasts were used to test for linear, quadratic, and cubic effects of additives. The PROC MIXED procedure of SAS (2004) was used for all statistical analyses. Significance was declared at $P < 0.05$, whereas $P < 0.10$ values were considered to be a trend. When a significant effect of additive dose or an additive dose \times diet-type interaction was detected, each additive dose mean was compared with the corresponding control by Dunnett test. Within each additive dose and diet-type, there were four values for each of the measured variables.

4.1.4 Results

There were marked differences between the fermentation characteristics of the two inocula used in this experiment (Table 4.1.2). The inoculum from MC-fed sheep had greater pH ($P = 0.03$), $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations ($P = 0.03$), acetate proportion ($P = 0.002$) and acetate:propionate ratio ($P = 0.006$), but lower propionate proportion ($P = 0.02$) compared with the inoculum from sheep fed the HC diet. In contrast, there were no differences between both inocula either in the

molar proportions of butyrate ($P = 0.75$), other VFA ($P = 0.98$) or in the concentrations of lactate ($P = 0.53$). Initial pH in the incubation medium was 6.98 and 6.59 for MC and HC diets, respectively (results not shown).

4.1.4.1 Garlic oil effects

Effects of supplementing batch cultures with GO on rumen fermentation variables are shown in Tables 4.1.3 and 4.1.4. Diet type affected ($P < 0.001$) all parameters measured, with the exception of total lactate concentrations ($P = 0.11$). Garlic oil \times diet- type interactions ($P < 0.001 - 0.003$) were detected for molar proportions of acetate, butyrate and caproate, production of gas and methane and acetate:propionate and methane:VFA ratios. Increasing levels of GO linearly decreased acetate ($P < 0.001$) and caproate ($P = 0.01$) proportions and acetate:propionate ratio ($P < 0.001$), but increased ($P < 0.001$) propionate, butyrate and valerate proportions. The dose required to detect a significant effect was generally lower for the MC diet than for the HC one. Increased amounts of GO linearly decreased ($P < 0.001$) the production of gas and methane. As a consequence of these changes, methane:VFA ratio was also reduced ($P < 0.001$) when increasing GO level. Proportion of methane in the gas produced and hydrogen recovery were also linearly reduced ($P < 0.001$) as GO levels increased. Neither linear nor quadratic effects ($P = 0.09 - 0.98$) of GO supplementation were observed for total VFA production, isobutyrate and isovalerate proportions, AFOM, final pH, and concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ and lactate.

Table 4.1.2 Mean values of pH and concentrations of volatile fatty acids (VFA), NH₃-N and total lactate in ruminal fluid used as inoculum for the *in vitro* incubations

Diet ^A	pH	Total VFA (mmol/L)	Rumen fluid						Ammonia-N (mg/L)	Total lactate (mg/L)
			Acetate (mmol/mol total VFA)	Propionate (mmol/mol total VFA)	Butyrate (mmol/mol total VFA)	Other VFA ^B (mmol/mol total VFA)	Acetate : propionate (mol/mol)			
MC	6.73	117	654	180	109	56.4	3.63	127	8.98	
HC	6.45	99	585	226	132	56.6	2.60	114	8.40	
s.e.m.	0.073	5.79	6.5	10.3	3.8	8.56	0.142	3.2	0.091	
<i>P</i> -value	0.03	0.05	0.002	0.02	0.75	0.98	0.006	0.03	0.53	

^ADiets fed to donor sheep. Diet MC (medium-concentrate) was composed of alfalfa hay and concentrate (500 and 500 g/kg DM, respectively) and diet HC (high-concentrate) was composed of barley straw and concentrate (150 and 850 g/kg DM, respectively).

^BCalculated as the sum of isobutyrate, isovalerate, valerate and caproate.

Table 4.1.3 Effects of five doses of garlic oil (0, 20, 60, 180 and 540 mg/L for CON, GO20, GO60, GO180 and GO540, respectively), on total volatile fatty acid production (VFA), molar proportions of VFA, acetate : propionate ratio, and apparently fermented organic matter (AFOM) after *in vitro* fermentation of diets (300 mg) with medium-concentrate (MC) and high-concentrate (HC) content by mixed rumen microorganisms for 16 h ($n = 4$)
L, linear effect of GO dose; Q, quadratic effect of GO dose

Variable	Diet	Treatment					s.e.m.	Statistical significance of the effects (<i>P</i> -value)			
		CON	GO20	GO60	GO180	GO540		GO		Diet	GO × diet
								L	Q		
Total VFA (mmol)	MC	2.07	2.07	2.08	1.99	1.93	0.057	0.26	0.09	<0.001	0.46
	HC	2.20	2.26	2.23	2.18	2.20	–	–	–	–	–
Molar proportion (mmol/mol total VFA) of											
Acetate	MC	629	625	608 ^A	569 ^A	547 ^A	5.3	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	HC	525	533	529	508 ^A	479 ^A	–	–	–	–	–
Propionate	MC	215	218	233 ^A	256 ^A	268 ^A	6.0	<0.001	0.003	<0.001	0.06
	HC	309	306	309	326 ^A	350 ^A	–	–	–	–	–
Butyrate	MC	106	108	112 ^A	124 ^A	138 ^A	2.9	<0.001	0.002	<0.001	<0.001
	HC	140	135	135	140	145	–	–	–	–	–
Isobutyrate	MC	12.5	11.5	10.8	12.5	13.4	3.46	0.94	0.35	<0.001	0.81
	HC	3.3	2.9	3.1	3.0	3.3	–	–	–	–	–
Isovalerate	MC	13.5	13.5	13.2	14.0	12.7	0.52	0.37	0.91	<0.001	0.55
	HC	6.9	7.3	7.5	7.2	6.4	–	–	–	–	–
Valerate	MC	17.5	17.7	18.3	19.3 ^A	19.1 ^A	0.46	<0.001	0.06	<0.001	0.56
	HC	13.3	13.3	13.8	14.7 ^A	15.5 ^A	–	–	–	–	–
Caproate	MC	6.8	6.2	7.1	4.8 ^A	1.5 ^A	0.53	0.01	0.05	<0.001	<0.001
	HC	2.7	2.6	2.7	2.2	1.5 ^A	–	–	–	–	–
Acetate : propionate (mol/mol)	MC	2.93	2.87	2.62 ^A	2.23 ^A	2.05 ^A	0.66	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	HC	1.70	1.75	1.71	1.57 ^A	1.37 ^A	–	–	–	–	–
AFOM (mg)	MC	177	178	180	173	171	5.5	0.49	0.16	<0.001	0.81
	HC	198	203	200	196	200	–	–	–	–	–

^AFor each diet and variable, means differ from CON ($P < 0.05$).

Table 4.1.4 Effects of five doses of garlic oil (0, 20, 60, 180 and 540 mg/L for CON, GO20, GO60, GO180 and GO540, respectively), on final pH, concentrations of NH₃-N and total lactate, production of gas and methane, methane/volatile fatty acid ratio (methane/VFA), proportion of methane in the gas produced and hydrogen recovery after *in vitro* fermentation of diets (300 mg) with a medium- (MC) and high- (HC) concentrate content by mixed rumen microorganisms for 16 h ($n = 4$)

L, linear effect of GO dose; Q, quadratic effect of GO dose

Variable	Diet	Treatment					s.e.m.	Statistical significance of the effects (<i>P</i> -value)			
		CON	GO20	GO60	GO180	GO540		GO		Diet	GO × diet
								L	Q		
pH	MC	6.63	6.66	6.64	6.67	6.65	0.027	0.16	0.89	<0.001	0.25
	HC	6.51	6.52	6.53	6.54	6.53	–	–	–	–	–
NH ₃ -N (mg/L)	MC	232	228	231	243	230	8.8	0.86	0.98	<0.001	0.85
	HC	95	99	93	91	90	–	–	–	–	–
Total lactate (mg/L)	MC	13.0	9.8	9.9	9.6	10.5	1.78	0.12	0.40	0.11	0.57
	HC	9.9	10.1	9.0	9.4	7.5	–	–	–	–	–
Gas (mmol)	MC	3.22	3.22	3.24	3.03 ^A	2.90 ^A	0.047	<0.001	0.001	<0.001	0.002
	HC	3.35	3.36	3.34	3.25 ^A	3.26 ^A	–	–	–	–	–
Methane (mmol)	MC	0.54	0.53	0.47 ^A	0.32 ^A	0.20 ^A	0.022	<0.001	<0.001	<0.001	0.001
	HC	0.47	0.42 ^A	0.42 ^A	0.35 ^A	0.18 ^A	–	–	–	–	–
Methane/VFA (mol/mol)	MC	0.26	0.26	0.23 ^A	0.16 ^A	0.10 ^A	0.012	<0.001	0.006	<0.001	0.003
	HC	0.21	0.19 ^A	0.19 ^A	0.16 ^A	0.08 ^A	–	–	–	–	–
Proportion of methane (mmol/mol gas)	MC	168	164	146 ^A	104 ^A	68 ^A	6.7	<0.001	0.003	<0.001	0.003
	HC	140	126 ^A	127 ^A	107 ^A	55 ^A	–	–	–	–	–
Hydrogen recovery (%)	MC	90.2	89.7	85.5	75.6 ^A	65.7 ^A	2.61	<0.001	0.16	0.02	0.06
	HC	92.2	84.4 ^A	87.8	83.8 ^A	71.2 ^A	–	–	–	–	–

^AFor each diet and variable, means differ from CON ($P < 0.05$).

4.1.4.2 Cinnamaldehyde effects

Effects of CIN on *in vitro* rumen fermentation are shown in Tables 4.1.5 and 4.1.6. Diet type affected ($P < 0.001 - 0.008$) most of parameters measured, with the exception of AFOM ($P = 0.07$), total lactate concentration ($P = 0.08$) and hydrogen recovery ($P = 0.99$). Cinnamaldehyde \times diet- type interactions occurred ($P < 0.001 - 0.04$) for all the parameters studied, with the exception of pH ($P = 0.15$) and proportions of caproate ($P = 0.77$), isobutyrate ($P = 0.98$) and isovalerate ($P = 0.59$). Increasing levels of CIN linearly increased ($P = 0.002$) acetate proportion and decreased propionate proportion ($P = 0.04$) and $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations ($P < 0.001$). Neither linear nor quadratic effects ($P = 0.10-$ to 0.99) of CIN supplementation were detected for production of total VFA, gas and methane, proportions of butyrate, isobutyrate, valerate, isovalerate and caproate, AFOM, final pH, and concentrations of lactate.

Table 4.1.5 Effects of five doses of cinnamaldehyde (0, 20, 60, 180 and 540 mg/L for CON, CIN20, CIN60, CIN180 and CIN540, respectively), on total volatile fatty acid production (VFA), molar proportions of VFA, acetate : propionate ratio, and apparently fermented organic matter (AFOM) after *in vitro* fermentation of diets (300 mg) with a medium- (MC) and high- (HC) concentrate content by mixed rumen microorganisms for 16 h ($n = 4$)

L, linear effect of CIN dose; Q, quadratic effect of CIN dose

Variable	Diet	Treatment					s.e.m.	Statistical significance of the effects (<i>P</i> -value)			
		CON	CIN20	CIN60	CIN180	CIN540		CIN		Diet	CIN × diet
		L	Q								
Total VFA (mmol)	MC	2.07	2.09	2.09	2.12	1.87 ^A	0.070	0.22	0.30	<0.001	<0.001
	HC	2.20	2.20	2.15	2.29	1.26 ^A	–	–	–	–	–
Molar proportion (mmol/mol total VFA) of:											
Acetate	MC	629	625	628	644 ^A	580 ^A	7.3	0.002	0.06	<0.001	<0.001
	HC	525	526	533	540 ^A	554 ^A	–	–	–	–	–
Propionate	MC	215	219	218	204	220	6.2	0.04	0.09	<0.001	<0.001
	HC	309	310	305	301	272 ^A	–	–	–	–	–
Butyrate	MC	106	105	104	104	148 ^A	2.9	0.10	0.63	<0.001	<0.001
	HC	140	138	137	136	139	–	–	–	–	–
Isobutyrate	MC	12.5	13.0	12.5	10.7	11.2	2.84	0.40	0.53	<0.001	0.98
	HC	3.3	3.1	3.1	1.6	3.8	–	–	–	–	–
Isovalerate	MC	13.5	13.4	13.4	12.5	12.4	0.56	0.27	0.38	<0.001	0.59
	HC	6.9	6.9	7.1	6.9	6.8	–	–	–	–	–
Valerate	MC	17.5	17.9	17.6	17.3	20.2 ^A	0.95	0.46	0.74	<0.001	0.02
	HC	13.3	13.1	12.9	12.7	19.8 ^A	–	–	–	–	–
Caproate	MC	6.8	6.9	7.1	7.4	8.5	0.69	0.73	0.94	<0.001	0.77
	HC	2.7	2.5	2.6	2.3	4.6	–	–	–	–	–
Acetate : propionate (μmol/μmol)	MC	2.93	2.86	2.88	3.17 ^A	2.64 ^A	0.097	0.02	0.04	<0.001	<0.001
	HC	1.70	1.70	1.75	1.79	2.04 ^A	–	–	–	–	–
AFOM (mg)	MC	177	178	178	181	166	6.5	0.28	0.30	0.07	<0.001
	HC	198	198	194	207	113 ^A	–	–	–	–	–

^AFor each diet and variable, means differ from CON ($P < 0.05$).

Table 4.1.6 Effects of five doses of cinnamaldehyde (0, 20, 60, 180 and 540 mg/L for CON, CIN20, CIN60, CIN180 and CIN540, respectively), on final pH, concentrations of NH₃-N and total lactate, production of gas and methane, methane/volatile fatty acid ratio (methane/VFA), proportion of methane in the gas produced and hydrogen recovery after *in vitro* fermentation of diets (300 mg) with a medium- (MC) and high- (HC) concentrate content by mixed rumen microorganisms for 16 h ($n = 4$)

L, linear effect of CIN dose; Q, quadratic effect of CIN dose

Variable	Diet	Treatment					s.e.m.	Statistical significance of the effects (P -value)			
		CON	CIN20	CIN60	CIN180	CIN540		CIN		Diet	CIN × diet
								L	Q		
pH	MC	6.63	6.62	6.65	6.65	6.64	0.028	0.37	0.86	<0.001	0.15
	HC	6.51	6.52	6.53	6.52	6.49	–	–	–	–	–
NH ₃ -N (mg/L)	MC	232	225	199 ^A	188 ^A	250 ^B	10.0	<0.001	0.44	<0.001	0.04
	HC	95	95	87	78 ^B	102	–	–	–	–	–
Total lactate (mg/L)	MC	13.0	10.8	12.3	12.1	292.5 ^A	49.3	0.99	0.99	0.08	0.04
	HC	9.9	9.1	10.8	8.8	103.9 ^A	–	–	–	–	–
Gas (mmol)	MC	3.22	3.25	3.26	3.22	3.12 ^A	0.048	0.60	0.93	0.008	<0.001
	HC	3.35	3.33	3.34	3.39	2.96 ^A	–	–	–	–	–
Methane (mmol)	MC	0.54	0.54	0.51	0.49	0.37 ^A	0.031	0.17	0.83	<0.001	<0.001
	HC	0.47	0.46	0.47	0.47	0.11 ^A	–	–	–	–	–
Methane/VFA (mol/mol)	MC	0.26	0.26	0.24	0.23	0.20 ^A	0.018	0.10	0.51	<0.001	0.009
	HC	0.21	0.21	0.22	0.21	0.09 ^A	–	–	–	–	–
Proportion of methane (mmol/mol gas)	MC	168	165	155	150	120 ^A	9.0	0.12	0.83	<0.001	<0.001
	HC	140	139	144	139	38 ^A	–	–	–	–	–
Hydrogen recovery (%)	MC	90.3	90.3	86.7	81.4 ^A	79.7 ^A	4.02	0.04	0.30	0.99	0.002
	HC	92.2	91.8	92.5	89.0	62.8 ^A	–	–	–	–	–

^AFor each diet and variable, means differ from CON ($P < 0.05$).

^BFor each diet and variable, means differ from CON ($P < 0.10$).

4.1.5 Discussion

This study was specifically designed to examine the effects of increasing doses of GO and CIN on *in vitro* ruminal fermentation as influenced by the type of diet (dairy versus fattening), and the differences in fermentation parameters observed between the inocula indicate the existence of different microbial communities promoted by feeding the two diets to donor sheep. Values of the main fermentation parameters are in agreement with fermentation patterns in sheep fed similar diet types (Carro et al. 2000; Ramos et al. 2009).

4.1.5.1 Garlic oil effects

Supplementation of GO did not decrease total VFA production with any diet, suggesting that ruminal fermentation was not inhibited even at the highest dosage (540 mg/L). Similar to our results Busquet et al. (2006) observed that GO at 300 mg/L did not affect total VFA production in batch cultures and a 50 : 50 forage : concentrate diet as substrate, although at 3000 mg/L decreased ($P < 0.05$) VFA production to 86% of that in CON cultures. Volatile fatty acids represent the main supply of metabolisable energy for ruminants, and therefore a reduction in their production would be nutritionally unfavourable for the host animal (Busquet et al. 2006) and should be avoided. The interactions GO \times diet type observed for some of the parameters determined could be due to different microbial communities present in the two inocula. In general, effects of GO were more pronounced for MC compared with HC diet, which would indicate that the effects of GO are diet-dependent.

In agreement with our results, other *in vitro* studies using batch cultures and a 50 : 50 forage : concentrate diet (Busquet et al. 2005a, 2006) or continuous culture fermenters fed a 30 : 70 forage : concentrate diet (Busquet et al. 2005b) demonstrated that GO supplementation at 300 mg/L increased the proportion of propionate and butyrate and reduced acetate proportion. In contrast,

Klevenhusen et al. (2011b) reported no effect of GO on VFA profile in the ruminal fluid from sheep fed a 50:50 forage:concentrate diet and supplemented daily with 5 g of GO for 19 days. Concentrations of GO in the study of Klevenhusen et al. (2011b), estimated assuming a mean ruminal volume of 7 L for a sheep (Ranilla et al. 1998), were ~736 mg/L, and even at this concentration, GO did not affect total VFA concentrations in the rumen or diet digestibility. It should be noticed that in sheep digesta outflow from the rumen would contribute to decrease ruminal GO concentrations over time, whereas there was no digesta outflow in the batch cultures. In our study, the amount of AFOM was not affected by any dose of GO with any diet type. The lack of effects of GO on total VFA production and AFOM indicates that GO did not modify overall diets fermentability, which agrees well with the results from the above cited studies.

Several *in vitro* studies have suggested that the effects of essential oils are pH-dependent, and this seems to be true for GO and garlic-related compounds (Cardozo et al. 2005; Kamel et al. 2008). Cardozo et al. (2005) found that GO had a more pronounced impact on rumen VFA profile at low compared with high rumen pH (5.5 versus 7.0), and proposed that the status of the molecules (i.e. dissociated or undissociated) may be dependent on rumen pH. However, batch cultures are usually highly buffered to enable ruminal microorganisms to grow for several hours without removal of fermentation products. In our study final pH in the cultures moved in a narrow range for both diets (6.52–6.67), although initial pH in the incubation media was higher for MC compared with HC diet (6.98 and 6.59, respectively). These results seem to preclude any influence of pH on the different effectiveness of GO observed for the two diets, and highlights the influence of the diet type on the observed differences.

Previous studies have reported significant methane suppressing effects of GO or its compounds (diallyl disulfide and allicin) supplemented at levels of 300 mg/L in batch cultures (Busquet et al. 2005b) and Rusitec fermenters (Soliva et al. 2011) or at 76 mg/L in batch cultures (Macheboeuf et al. 2006). Extracts of garlic

bulbs or even garlic bulbs mixed with the diet have been shown to reduce methane production in batch cultures by Patra et al. (2010) and Staerfl et al. (2010), respectively. In contrast, no effects on methane production were observed by Kamel et al. (2008) with low doses of allicin and diallyl disulfide (up to 10 mg/L) and Kongum et al. (2010) with garlic powder at 320 mg/L. Only a few *in vivo* trials have investigated the effects of GO or its compounds on methane production, but their results are contrasting. Klevenhusen et al. (2011a) reported a decrease in methane production when sheep fed a 50 : 50 forage : concentrate diet were supplemented with diallyl disulfide (4 g per day), but no effects were shown with lower doses of diallyl disulfide (2 g) or 5 g of GO per day (Klevenhusen et al. 2011b). No effects on methane production were found when supplementing diallyl disulfide to lactating cows (3.3 g per day; van Zijderveld et al. 2011) or garlic bulbs (1% of DM intake) to sheep (Patra et al. 2011) and fattening bulls (Staerfl et al. 2012). Kongmun et al. (2011) observed that supplementing swamp buffalo with a mixture of 7% coconut oil and 100 g of garlic powder reduced methane production by 9.1%, but a similar reduction was observed only with 7% coconut oil, which would indicate that the depressing effect on methane production was due to coconut oil rather than to garlic powder. It is worth to mention again that no dose of GO negatively affected overall diets fermentability, and therefore the methane : VFA ratio was decreased by GO60, GO180 and GO540, which would indicate a higher supply of energy for the host animal.

Hydrogen recovery, calculated from the stoichiometric relationships between the end products formed, was significantly lowered by GO180 and GO540 for both diets. This would indicate accumulation of hydrogen or a reduced end product other than methane, propionate, butyrate and valerate, since these are involved in the calculation of recovered hydrogen (Demeyer 1991). The lower hydrogen recovery found in our study does support the toxicity of organosulfur

compounds from GO on ruminal methanogens, as previously indicated by others (Martin et al. 2010).

4.1.5.2 Cinnamaldehyde effects

At doses of 20, 60 and 180 mg/L, CIN had only subtle effects on *in vitro* ruminal fermentation. Compared with CON, CIN180 significantly increased acetate proportion by 2.4 and 2.9% for MC and HC diets, respectively, without affecting the proportions of any other VFA or total VFA production. This was reflected in a significant increase in acetate:propionate ratio in the CIN180-supplemented cultures for MC diet, but no changes were detected for HC diet. The minor changes in VFA proportions produced by CIN supplementation up to 180 mg/L did not result in differences in the amount of AFOM for any diet type, indicating no effect on diet fermentability. Similarly, Macheboeuf et al. (2008) reported that supplying CIN at 132 or 264 mg/L in batch cultures with a HC diet did not alter total VFA production.

Supplementing CIN540 significantly reduced total VFA production to 90 and 58% of CON for MC and HC diets, respectively. Furthermore, CIN540 reduced acetate proportion for MC diet, but increased acetate and reduced propionate proportions for HC diet, indicating a differential effect of CIN on VFA profile for the two diets. This is also indicated by the different response observed to CIN540 in acetate:propionate ratio, which was significantly decreased for MC diet, but increased for HC diet. These results would indicate some inhibition of fermentation activity when CIN was supplemented at 540 mg/L, being more pronounced for HC diet than for MC diet. This hypothesis is further supported by the lower gas (97 and 88% of CON values for MC and HC diets, respectively), and methane (69 and 24% of CON values for MC and HC diets, respectively), production. Moreover, lactate concentrations in CIN540 cultures were 23 and 10 times higher compared with those in CON cultures for MC and HC diets, respectively, which might be due to an inhibition of lactate utilisers, thus

resulting in lactate accumulation. In agreement with our results, Macheboeuf et al. (2008) reported that supplying CIN at 396 mg/L in batch cultures with a 75 : 25 forage : concentrate diet decreased production of methane by 19% and VFA by 13%. In the study of Macheboeuf et al. (2008), CIN at 661 mg/L almost completely inhibited methane production (~94%) and dramatically reduced total VFA (~60%). Such changes indicate that, at high doses, the antimicrobial activity of CIN is sufficient to almost completely inhibit rumen microbial fermentation.

In our study, CIN60 and CIN180 significantly decreased NH₃-N concentrations compared with CON cultures for MC diet, but for HC diet only a trend of CIN180 to decrease NH₃-N concentrations was observed. The effects of CIN on rumen NH₃-N concentrations are controversial, and seem to be dose- and diet-dependent. Busquet and co-workers reported that CIN (98% purity) reduced NH₃-N concentrations by 12% in dual-flow continuous fermenters fed a HC diet and supplemented with 312 mg of CIN/L (Busquet et al. 2005a), and by 9.3% in batch cultures with a 50 : 50 forage : concentrate diet and supplemented with 310 mg of CIN/L (Busquet et al. 2006). Cardozo et al. (2005) reported reductions of 67 and 46% in the NH₃-N concentrations when supplementing CIN at 300 mg/L to batch cultures with a 10 : 90 forage : concentrate diet at pH = 7.0 or 5.5, respectively. In contrast, Benchaar et al. (2007) reported no effects of supplementing CIN at 400 mg/L to batch cultures of rumen fluid with a 51 : 49 forage : concentrate diet. In our study, CIN60 and CIN180 reduced NH₃-N concentrations by 14 and 19%, respectively, with MC diet, and by 8.4 and 18% for HC diet, which agrees well with the results of Busquet et al. (2005a, 2006)). On the contrary, Chaves et al. (2008) found no effect of CIN on rumen NH₃-N concentrations in lambs fed a barley grain- based diet (700 g barley/kg of DM) and supplemented daily with 258 mg of CIN (86 mg/L, assuming a rumen volume of 3 L in 24-kg bodyweight lambs; Chaves et al. 2008). No effects on rumen NH₃-N concentrations were also found by Yang et al. (2010) when supplementing CIN to beef steers fed a diet containing 800 of barley grain per kg

of DM and supplemented daily with 400, 800 and 1600 mg of CIN (concentrations of 6.7, 13.3 and 26.7 mg/L, respectively, assuming a rumen volume of 60 L for 538-kg bodyweight steers; Yang et al. 2010). The lack of effects found by Chaves et al. (2008) and Yang et al. (2010) in ruminants fed a HC diet agrees with our results for CIN20 and CIN60 with HC diet, and suggests that higher doses of CIN are needed to modify rumen fermentation *in vivo*. However, in the study of Yang et al. (2010), the highest dose decreased nutrient intake and ruminal digestibility, especially NDF and feed N digestibility, which highlights the importance of investigating the potential anti-nutritional side-effects of feed additives.

4.1.5.3 Diet effects

Differences between the two diet types in fermentation parameters followed the pattern observed in the ruminal fluid obtained from sheep fed the same diets (see Table 4.2.2). Differences in VFA profile between diets were also maintained in the cultures supplemented with GO and CIN, although the magnitude of the differences was sometimes modified by additive addition, which indicates different shifts in rumen microbial fermentation after additive supplementation. The higher NH₃-N concentrations in the cultures with MC diet compared with those in HC-cultures were probably due to the higher crude protein content of MC diet. Our results agree with previous studies (Gómez et al. 2005; Martínez et al. 2010) showing that methane production *in vitro* was affected by the forage:concentrate ratio in both the diet of donor sheep and the incubated substrate. Methane production was ~1.2 times higher for MC compared with HC diet (averaged across experimental treatments). However, it has to be taken into account that the *in vitro* cultures used in the present study were heavily buffered, and the pH decrease observed in animals fed HC diets could not be reproduced; therefore, the influence of pH on the efficacy of the tested additives was not accounted for in the present study. Although *in vitro* studies have some

limitations, they constitute a useful tool to test a high number of experimental treatments before performing *in vivo* trials.

4.1.6 Conclusions

The effects of GO and CIN on *in vitro* fermentation of two diet types (dairy versus intensive fattening) were both dose- and diet-dependent. In general, more effects were observed for GO compared with CIN when supplemented at the same levels. Garlic oil had more marked effects on VFA proportions with dairy diet, whereas effects on methane production were achieved with lower GO doses for the fattening one. Supplementation of GO up to 540 mg/L did not have any detrimental effect on ruminal fermentation, but the same level of CIN inhibited VFA production for both diets. In conclusion, the effectiveness of GO and CIN to manipulate ruminal fermentation may depend on the characteristics of the diet fed to the animals, which highlights the importance of testing these additives with different diet types. These results would have important practical implications if they are confirmed *in vivo*, although it has to be taken into account that some large doses used in the present study would be impractical to use in ruminant feeding.

Acknowledgements

Funding was provided by the Spanish C.I.C.Y.T. (Project AGL2008-04707-C02-02 and Acción Integrada AIB2010NZ-00190). C. Saro gratefully acknowledges the receipt of a scholarship from the M.E.C. of Spain (AP2006-03049).

4.1.7 References

- Association of Official Analytical Chemists (1999). 'Official methods of analysis.' 16th eEdition. 5th revision. (AOAC International: Gaithersburg, MD)
- Benchaar C, Chaves AV, Fraser GR, Wang Y, Beauchemin KA, McAllister TA (2007) Effects of essential oils and their components on *in vitro* rumen microbial fermentation. *Canadian J. Anim. Sci.* 87, 413–419. doi:10.4141/CJAS07012

- Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C (2005a) Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 88, 2508–2516. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72928-3
- Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Carro MD, Kamel C (2005b) Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 88, 4393–4404. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)73126-X
- Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C (2006) Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 89, 761–771. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72137-3
- Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A (2007) Invited review: eEssential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90, 2580–2595. doi:10.3168/jds.2006-644
- Cardozo PW, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C (2004) Effects of natural plant extracts on protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 82, 3230–3236.
- Cardozo PW, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C (2005) Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *J. Anim. Sci.* 83, 2572–2579.
- Carro MD, Valdés C, Ranilla MJ, González JS (2000) Effect of forage to concentrate ratio in the diet on ruminal fermentation and digesta flow kinetics in sheep. *Animal Science (Penicuik, Scotland)* 70, 127–134.
- Chaves AV, Stanford K, Dugan ME, Gibson LL, McAllister TA, Van Herk F, Benchaar C (2008) Effect of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry oils on performance, blood metabolites, and carcass characteristics of growing lambs. *Livest. Sci.* 117, 215–224. doi:10.1016/j.livsci.2007.12.013
- Demeyer DI (1991). Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. In 'Rumen microbial metabolism and ruminant digestion'. (Ed. JP Jouany) pp. 217–237. (INRA Editions: Paris)
- Demeyer DI, Van Nevel CJ (1975). Methanogenesis, an integrated part of carbohydrate fermentation, and its control. In 'Digestion and metabolism in the ruminant'. (Eds IW McDonald, ACI Warner) pp. 73–97 (University of New England Publishing Unit: Armidale)
- García-Martínez R, Ranilla MJ, Tejido ML, Carro MD (2005) Effects of disodium fumarate on in vitro rumen microbial growth, methane production and fermentation of diets differing in their forage:concentrate ratio. *Br. J. Nutr.* 94, 71–77. doi:10.1079/BJN20051455

- Goering MK, Van Soest PJ (1970). Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). In 'Agricultural handbook, No. 379'. (Agricultural Research Services, USDA: Washington, DC).
- Gómez JA, Tejido ML, Carro MD (2005) Mixed rumen microorganisms growth and rumen fermentation of two diets in RUSITEC fermenters: influence of disodium malate supplementation. *Br. J. Nutr.* 93, 479–484.
- Kamel C, Greathead HMR, Ranilla MJ, Tejido ML, Carro MD (2008) Effects of allicin and diallyl disulfide on in vitro fermentation of a mixed diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 351–363. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.05.050
- Klevenhusen F, Duval S, Zeitz JO, Kreuzer M, Soliva CR (2011a) Diallyl disulphide and lovastatin: effects on energy and protein utilisation in, as well as methane emission from sheep. *Archives of Animal Nutrition* 65, 255–266. doi:10.1080/1745039X.2011.588845
- Klevenhusen F, Zeitz JO, Duval S, Kreuzer M, Soliva CR (2011b) Garlic oil and its principal component diallyl disulfide fail to mitigate methane, but improve digestibility in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167, 356–363. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.071
- Kongmun P, Wanapat M, P, Navanukraw, C. 2010. Effect of coconut oil and garlic powder on in vitro fermentation using gas production technique. *Livest. Sci.* 127, 38-44.
- Kongmun P, Wanapat M, Pakdee P, Navanukraw C, Yu Z (2011) Manipulation of rumen fermentation and ecology of swamp buffalo by coconut oil and garlic powder supplementation. *Livest. Sci.* 135, 84–92. doi:10.1016/j.livsci.2010.06.131
- Macheboeuf D, Lassalas B, Ranilla MJ, Carro MD, Morgavi D (2006) Dose–response effect of diallyl disulfide on ruminal fermentation and methane production in vitro. *Reproduction, Nutrition, Development* 46(Suppl. 1), S103.
- Macheboeuf D, Morgavi DP, Papon Y, Mousset JL, Arturo-Schaan M (2008) Dose–response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 335–350. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.05.044
- Martin C, Morgavi DP, Doreau M (2010) Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4, 351–365. doi:10.1017/S1751731109990620
- Martínez ME, Ranilla MJ, Tejido ML, Ramos S, Carro MD (2010) The effect of the diet fed to donor sheep on in vitro methane production and ruminal fermentation of diets of variable composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 158, 126–135. doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.04.005

- Patra AK, Kamra DN, Agarwal N (2010) Effects of extracts of spices on rumen methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feeds in vitro. *J. Sci. Food Agric.* 90, 511–520.
- Patra AK, Kamra DN, Bhar R, Kumar R, Agarwal N (2011) Effect of *Terminalia chebula* and *Allium sativum* on in vivo methane emission by sheep. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 95, 187–191. doi:10.1111/j.1439-0396.2010.01039.x
- Ramos S, Tejido ML, Martínez ME, Ranilla MJ, Carro MD (2009) Microbial protein synthesis, ruminal digestion, microbial populations, and N balance in sheep fed diets varying in forage to concentrate ratio and type of forage. *J. Anim. Sci.* 87, 2924–2934. doi:10.2527/jas.2009-1938
- Ranilla MJ, López S, Giráldez FJ, Valdés C, Carro MD (1998) Comparative digestibility and digesta flow kinetics in two breeds of sheep. *Animal Science (Penicuik, Scotland)* 66, 389–396. doi:10.1017/S1357729800009528
- SAS (Statistical Analysis Systems) (2004) 'SAS procedures guide. Release 9.1.' (SAS Institute Inc.: Cary, NC)
- Soliva CR, Amelchanka SL, Duval SM, Kreuzer M (2011) Ruminal methane inhibition potential of various pure compounds in comparison with garlic oil as determined with a rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 106, 114–122. doi:10.1017/S0007114510005684
- Staerfl SM, Kreuzer M, Soliva CR (2010) In vitro screening of unconventional feeds and various natural supplements for their ruminal methane mitigation potential when included in a maize-silage based diet. *Journal of Animal and Feed Sciences* 19, 651–654.
- Staerfl SM, Zeitz JO, Kreuzer M, Soliva CR (2012) Methane conversion rate of bulls fattened on grass or maize silage as compared with the IPCC default values, and the long-term methane mitigation efficiency of adding acacia tannin, garlic, maca and lupine. *Agriculture Ecosystems & Environment* 148, 111–120. doi:10.1016/j.agee.2011.11.003</jrn>
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2
- Weimer PJ, Waghorn GC, Odt CL, Mertens DR (1999) Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 122–134. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75216-1
- Yang WZ, Ametaj BN, Benchaar C, Beauchemin KA (2010) Dose response to cinnamaldehyde supplementation in beef growing heifers: ruminal and intestinal digestion. *J. Anim. Sci.* 88, 680–688. doi:10.2527/jas.2008-1652
- van Zijderveld SM, Fonken B, Dijkstra J, Gerrits WJ, Perdok HB, Fokkink W, Newbold JR (2011) Effects of a combination of feed additives on methane

production, diet digestibility, and animal performance in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94, 1445–1454. doi:10.3168/jds.2010-3635

4.2. Prueba 2. Comparison of fermentation characteristics and bacterial diversity in the rumen of sheep and in batch cultures of rumen microorganism

Comparison of fermentation characteristics and bacterial diversity in the rumen of sheep and in batch cultures of rumen microorganisms

Short title: Comparison *in vitro* vs. *in vivo* rumen fermentation in sheep

I. Mateos¹, M. J. Ranilla^{1,2}, C. Saro¹, y M. D. Carro³

¹ Departamento de Producción Animal. Universidad de León. 24007 León, Spain

² Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346

Grulleros, León, Spain

³ Departamento de Producción Animal, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad

Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

The Journal of Agricultural Science, 2015

4.2.1 Abstract

The objective of the current study was to assess how closely batch cultures of rumen microorganisms (BC) can mimic the dietary differences in fermentation characteristics found in the rumen, and to analyse changes in bacterial diversity over the *in vitro* incubation period. Four ruminally and duodenally cannulated sheep were fed 4 diets having forage:concentrate ratio (FCR) of 70:30 or 30:70, with either alfalfa hay or grass hay as forage. Rumen fluid from each sheep was used to inoculate BC containing the same diet fed to the donor sheep, and the main rumen fermentation parameters were determined after 24 h of incubation. There were differences between BC and sheep in the magnitude of most measured parameters, but BC detected differences among diets due to forage type similar to those found in sheep. In contrast, BC did not reproduce the dietary differences due to FCR found in sheep for pH, degradability of neutral detergent fibre and total volatile fatty acids (VFA) concentrations. There were differences between systems in the magnitude of most determined parameters and BC showed higher pH values and NH₃-N concentrations, but lower fibre degradability and VFA and lactate concentrations compared with sheep. There were significant relationships ($P < 0.05$) between *in vivo* and *in vitro* values for molar proportions of acetate, propionate and butyrate and acetate:propionate ratio. The automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) of the 16S ribosomal DNA showed that FCR ratio had no effect on bacterial diversity either in the sheep rumen fluid used as inoculum or in BC samples. In contrast, bacterial diversity was greater with alfalfa hay diets than those with grass hay in the inoculum, but was unaffected by forage type in the BC. Similarity index between the bacterial communities in the inocula and those in the BC ranged from 67.2 to 74.7%, and was unaffected by diet characteristics. Bacterial diversity was lower in BC than in the inocula with 14 peaks out of a total of 181 detected in

the ARISA electropherograms never appearing in BC samples, which suggests that incubation conditions in the BC may have caused a selection of some bacterial strains. However, each BC sample showed the highest similarity index with its corresponding rumen inoculum, which highlights the importance of using rumen fluid from donors fed a diet similar to that being incubated in BC when conducting *in vitro* experiments.

4.2.2 Introduction

The complexity of the rumen ecosystem, the difficulties of working with fistulated animals and the increased public awareness of the animal rights have contributed to the development of numerous *in vitro* techniques to simulate rumen fermentation. In the last years there has been an increased use of the batch cultures of ruminal microorganisms (BC), which are being widely utilized for nutritive evaluation and screening feed additives, among other multiple purposes. The BC are a rapid and precise *in vitro* method that only needs a small amount of substrate, but they require an inoculum which may influence the fermentation process (Mould *et al.* 2005). As it has been previously stated (Warner, 1956; Czerkawski and Breckenridge, 1977), it is challenging to evaluate how closely an *in vitro* system can mimic the *in vivo* rumen and to select the right parameters to be measured. To date, studies comparing fermentation patterns in BC with those found *in vivo* are very limited and have contradictory results. Rymer & Givens (2002) tested 3 mixed diets and found significant relationships between the volatile fatty acid (VFA) pattern produced in BC and in the rumen of sheep. In contrast, Brown *et al.* (2002) found no relationship between the VFA pattern measured in BC and in the rumen of steers fed 8 different forages and attributed the lack of correlation between *in vitro* and *in vivo* data to differences in the diets fed to the steers and those fed to the ruminal fluid donors in the *in vitro* trial.

Any *in vitro* system designed to simulate rumen fermentation should mimic the natural rumen, including the physical environment and the maintenance of key microbial populations (Ziemer *et al.* 2000). Ideally, the microbial composition in the *in vitro* system should be representative, in terms of quantity and quality, of that found in the rumen of the host animal. Despite the importance of this aspect, the number of studies comparing microbial populations in the rumen with those in the *in vitro* systems is limited, and most of them have been conducted in continuous fermenters. To our knowledge, only Prates *et al.* (2010) have compared the structure of bacterial communities in BC with that in the rumen fluid used as inoculum, and reported a mean similarity index of 70.2% between both bacterial communities; this would indicate that some changes in bacterial composition were produced over the 24 h incubation period, although only one diet was tested in this study and the magnitude of the changes may be influenced by the composition of the incubated diet.

The objectives of this study were to assess how closely BC can mimic the *in vivo* rumen fermentation of diets of variable composition and to analyse changes in bacterial communities over the incubation period as assessed by automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA). For that purpose, 4 different diets were incubated in BC, and the results were validated with those determined in sheep fed the same diets.

4.2.3 Materials and methods

4.2.3.1 Animals, diets and experimental design

All the experimental procedures were approved by the León University Institutional Animal Care and Use Committee. The *in vitro* experiment was conducted in conjunction with an *in vivo* study analysing the effects of forage to concentrate ratio (FCR) and type of forage on rumen fermentation characteristics, diet digestibility and microbial protein synthesis in sheep (Ramos *et al.* 2009a).

For the present study, 4 of the 6 Merino sheep utilized in the previous study were selected. The sheep (58.5 ± 3.16 kg of body weight) were fitted with permanent ruminal and T-type duodenal cannulas. Animals were housed in individual pens and had continuous access to fresh water and vitamin-mineral block over the experimental period.

The 4 experimental diets had high forage (HF; 700 g/kg; dry matter (DM) basis) or high concentrate (HC; 700 g/kg DM) content, with either alfalfa hay (HFA and HCA) or grass hay (HFG and HCG) as forage. The same concentrate was used in all diets. Ingredient and chemical composition of diets is shown in Table 4.2.1. Diets were fed twice daily (0800 and 2000 h) at a daily rate of 56 g DM/kg body weight^{0.75} to minimize feed selection. Diet intake was monitored daily and all animals consumed all the diet offered, with the exception of one sheep that occasionally left some refusals (less than 100 g/day) of diet HFG.

The experiment had a 4 x 4 Latin square design with four 34-days experimental periods. Each period consisted of 22 days of dietary adaptation, 8 days (days 23 to 30) for determination of *in vivo* parameters, and 2 days for conducting the *in vitro* experiment. Sheep data collection included measurements of rumen fermentation characteristics (pH and concentrations of NH₃-N, VFA and lactate) and of rumen apparent degradability of dry matter (DMD) and neutral-detergent fibre (NDFD). On day 30 of each period, ruminal content samples (about 50 g) were taken through the cannula of each sheep at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, and 22 h after the morning feeding and strained through 4 layers of cheesecloth. The pH of the fluid was immediately measured, and three samples were taken: 5 ml of fluid were added to 5 ml of deproteinizing solution (100 g of metaphosphoric acid and 0.6 g of crotonic acid per l) for volatile fatty acid (VFA analysis), 2 ml were added to 2 ml of 0.5 M HCl for NH₃-N determination and 5 ml were frozen at -20°C for total lactate analyses. In order to assess the duodenal flow of digesta, Cr-mordanted fibre and Co-EDTA were used as solid and fluid phase markers, respectively. From days 18 to 26, 15 g of

Cr-mordanted fibre were administered daily via the ruminal cannula into four equal portions at 08:00, 14:00, 20:00 and 02:00 h and Co-EDTA was infused into the rumen (60 mg of Co in 250 ml of distilled water/d) by means of a peristaltic pump. On days 23, 24 and 25 duodenal digesta samples were collected at 6 h intervals and samples were pooled by sheep and stored at -20°C . Duodenal samples were thawed at 4°C , homogenized, and one-half of each sample was centrifuged ($1,000 \times g$, 5 min, 4°C) to obtain particulate matter (Faichney 1975). Both samples of whole duodenal digesta and particulate matter were lyophilised and analyzed for ash and neutral detergent fibre. More details on *in vivo* procedures are given in Ramos *et al.* (2009a).

Table 4.2.1 Ingredient (g/kg dry matter) and chemical composition (g/kg dry matter) of the experimental diets with 700 g of forage/kg dry matter (HF) or 300 g of forage/kg dry matter (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage

Item	HFA	HFG	HCA	HCG
Ingredient				
Alfalfa hay	700	-	300	-
Grass hay	-	700	-	300
Barley	64	64	152	152
Gluten feed	61	61	145	145
Wheat middlings	57	57	137	137
Soybean meal	41	41	97	97
Palmkern meal	38	38	90	90
Wheat	15	15	35	35
Corn	15	15	35	35
Vitamin-mineral premix ¹	10	10	10	10
Chemical composition				
Dry matter (g/kg fresh matter)	927	925	925	924
Organic matter	913	927	913	919
Nitrogen	26.9	19.4	28.3	25.6
Neutral-detergent fibre	426	499	374	401
Acid-detergent fibre	269	238	187	174

¹ Vitamin-mineral premix contained per kilogram of DM: 11,250 IU of vitamin A; 2,250 IU of vitamin D₃; 25 mg of Vitamin E; and 10 mg of CuSO₄5H₂O.

Samples of each diet offered to sheep were ground (1 mm sieve) and used as substrates for the BC incubations. On day 32 of each experimental period, about 400 g of rumen contents were taken through the cannula of each sheep immediately before the morning feeding and strained through 4 layers of cheesecloth. Rumen fluid from each sheep was mixed with the buffer-mineral solution of Goering & Van Soest (1970; modified to reduce the content of NH_4HCO_3 to half of its initial concentration; no trypicase added) in a proportion 1:4 (vol/vol) at 39°C under continuous flushing with CO_2 . About 100 ml of each mixture (inoculum) were immediately taken in sterile containers, frozen at -80°C, and freeze-dried before DNA extraction. Four bottles (120 ml of volume) containing 400 mg DM of each diet were filled (40 ml/per bottle) with the inoculum from the sheep fed the same diet. Bottles were capped and incubated at 39°C. After 24 h, 2 bottles of each diet were opened, the pH was immediately measured, and samples of bottles' contents were taken for VFA, $\text{NH}_3\text{-N}$ and total lactate analyses as described above. Contents of the bottles were then transferred to previously weighed filter crucibles, washed with 50 ml of hot (50°C) distilled water, and the crucibles dried at 50°C and weighed to calculate apparent DMD. Finally, the residue of the crucibles was analysed for neutral-detergent fibre (NDF) to calculate NDFD. The remaining 2 bottles of each diet were emptied in sterile containers, mixed, immediately frozen at -80°C, and freeze-dried before DNA extraction.

4.2.3.2 DNA extraction and automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA)

In order to analyse the changes in bacterial communities over the 24 h of incubation in the BC, DNA was isolated in duplicate from samples (100 mg of DM) of inoculum and BC contents after mechanical disruption of microorganisms with a MiniBeadbeater (3 min; Biospec Products, Bartlesville,

OK, USA). The DNA was extracted following the procedure described by Yu & Morrison (2004), with the exception that an additional step involving the treatment of samples with cetyltrimethylammonium bromide was included to remove PCR inhibitors. The QIAamp DNA Stool Mini Kit columns (QIAGEN, Valencia, CA, USA) were used to purify the DNA. Absorbance ratios (A₂₆₀:A₂₈₀) of eluted DNA measured in a Nanodrop ND-1000 (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE) were between 1.71 and 2.00. The DNA was amplified using universal bacterial primers 16S-1392F and 23S-125R as described by Saro *et al.* (2012). Thermocycling and ARISA technique were conducted in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) and a MegaBACE 500 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Bucks, United Kingdom), respectively, as reported by Ramos *et al.* (2009b). Peaks were identified by comparison with an internal size standard using the GeneMarker Software v1.80 (SoftGenetics, State College, PA, USA) and the presence/absence of the different peaks was considered to compare the electropherograms profiles by using a similarity matrix. The Shannon's diversity index was used to evaluate the diversity of bacterial communities, and dendrograms were constructed using the percent similarity and unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) options in the MVSP v3.12d software (Kovach Computing Service, Anglesey, Wales, UK).

Chemical analyses

Dry matter (ID 934.01), ash (ID 942.05) and N (ID 984.13) were determined according to the Association of Official Analytical Chemists (1999), and NDF and acid-detergent fibre (ADF) analyses were carried out according to Van Soest *et al.* (1991) in an ANKOM220 Fibre Analyzer unit (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA) and using sodium sulphite and heat-stable amylase. Concentration of NH₃-N was determined using a spectrophotometer by the method of phenol-hypochlorite (Weatherburn 1967) and those of VFA by gas

chromatography as described by Carro *et al.* (1992). Analysis of lactate concentration was carried out following the procedure of Kimberley & Taylor (1996).

4.2.3.3 Calculations and statistical analyses

Duodenal flow was calculated from the concentrations of Cr and Co in duodenal digesta phases using the dualphase marker method of Faichney (1975). Samples were mathematically reconstituted to create a representative sample from the concentrations of each analyzed nutrient in each of the duodenal phases (Faichney 1975). Values of concentrations of VFA, NH₃-N and lactate in sheep rumen were averaged across sampling times before statistical analysis (4 values per diet). Values measured in the 2 bottles incubated for each inoculum in each period in the *in vitro* trial were averaged before statistical analysis (4 values per diet).

In vivo and *in vitro* data were analyzed separately to assess the effects of dietary treatments on each fermentation system. Data were analysed as a mixed model using the PROC MIXED of SAS (2012). The effects FCR, forage, FCR x forage interaction, and period were considered fixed, and sheep (*in vivo* trial) and inoculum (*in vitro* study) effects were considered random. Effects were considered significant at $P \leq 0.05$. Relationships between fermentation variables determined in BC and in sheep were tested by correlation analyses using the CORR procedure of SAS (2012).

4.2.4 Results

The effects of FCR ratio and type of forage on ruminal fermentation parameters and diet degradability in sheep and BC are shown in Table 4.2.2. There were no FCR x forage interactions ($P = 0.122$ to 0.890) for any measured variable in BC with the exception of the molar proportion of valerate ($P = 0.041$) and a trend for apparent DMD ($P=0.060$), which agrees well with the results

obtained in sheep, in which FCR x forage interaction was only found for valerate proportion ($P < 0.001$) and a trend for apparent DMD ($P=0.079$).

Table 4.2.2 Effect of forage:concentrate ratio (FCR) and type of forage on apparent degradability(g/g) of dry matter and neutral-detergent fibre, concentrations of NH₃-N (mg/l), lactate (mg/l) and total volatile fatty acids (mmol/l), molar proportions (mol/100 mol) of individual volatile fatty acids and acetate/propionate ratio (mol/mol) in sheep and in batch cultures of rumen microorganisms (BC) inoculated with sheep ruminal fluid

Item ²		Diet ¹				SEM	P-value		
		HFA	HFG	HCA	HCG		FCR	FOR	FCR x Forage
pH	Sheep	6.36	6.49	6.23	6.17	0.046	0.003	0.270	0.151
	BC	6.76	6.83	6.65	6.69	0.038	0.064	0.389	0.473
Apparent degradability									
Dry matter	Sheep	0.512	0.492	0.420	0.441	0.0878	<0.001	0.967	0.060
	BC	0.580	0.568	0.612	0.622	0.0238	<0.001	0.449	0.079
Neutral-detergent fibre	Sheep	0.622	0.632	0.523	0.584	0.0135	0.005	0.079	0.106
	BC	0.399	0.388	0.337	0.345	0.0120	0.222	0.678	0.284
NH ₃ -N	Sheep	184	83.1	204	122	12.5	0.041	0.004	0.533
	BC	300	204	429	369	16.4	0.002	0.003	0.122
Lactate	Sheep	35.9	28.8	39.3	32.8	2.97	0.112	0.115	0.966
	BC	19.8	14.4	18.9	15.4	1.94	0.883	0.268	0.268
Total volatile fatty acids	Sheep	107.8	84.4	98.1	90.2	2.88	0.668	0.001	0.117
	BC	61.3	52.9	73.0	63.4	2.18	0.010	0.013	0.816
Molar proportions of									
Acetate	Sheep	66.2	68.0	62.7	63.4	0.45	<0.001	0.136	0.112
	BC	63.4	64.3	57.5	58.9	0.65	<0.001	0.144	0.331
Propionate	Sheep	17.3	18.6	17.6	18.0	0.30	0.510	0.004	0.352
	BC	19.5	22.6	18.5	21.1	0.72	0.733	0.011	0.707
Butyrate	Sheep	11.9	10.5	15.2	14.9	0.40	<0.001	0.049	0.129
	BC	11.7	9.9	18.0	15.0	0.57	<0.001	0.010	0.859

Table 4.2.2. Continued

Item		Diet ¹				SEM	P-value		
		HFA	HFG	HCA	HCG		FCR	Forage	FCR x Forage
Molar proportions of									
Isobutyrate	Sheep	1.27	0.79	1.20	0.84	0.076	0.631	0.003	0.156
	BC	1.13	0.57	1.34	0.97	0.105	0.144	0.006	0.324
Isovalerate	Sheep	1.19	0.70	1.22	0.94	0.032	0.020	<0.001	0.124
	BC	1.87	1.04	2.63	1.79	0.177	0.046	0.004	0.642
Valerate	Sheep	1.94	1.14	1.68	1.45	0.023	0.340	<0.001	<0.001
	BC	2.11	1.37	1.82	1.78	0.139	0.706	0.031	0.041
Caproate	Sheep	0.22	0.27	0.41	0.43	0.017	<0.001	0.200	0.250
	BC	0.21	0.16	0.24	0.29	0.030	0.046	0.950	0.335
Acetate/propionate	Sheep	3.85	3.67	3.56	3.52	0.076	0.397	0.082	0.133
	BC	3.25	2.85	3.11	2.79	0.117	0.262	0.029	0.413

¹ HFA: 700 g of alfalfa hay/kg dry matter; HFG: 700 g of grass hay/kg dry matter; HCA: 300 g of alfalfa hay/kg dry matter; HCG: 300 g of grass hay/kg dry matter. The same concentrate was used in all diets.

² Values for pH, NH₃-N, lactate and VFA in sheep are means across sampling times of 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 and 22 h after the morning feeding. Values in BC were measured after 24 h incubation.

Reducing the forage proportion in the diet decreased rumen pH in sheep ($P = 0.003$), but only a trend was observed in the BC ($P = 0.064$). Whereas in sheep fermentation of HF diets resulted in greater ($P < 0.05$) apparent DMD and NDFD compared with HC diets, in BC HF diets tended to have lower ($P = 0.052$) DMD than HC diets and no differences ($P = 0.222$) in NDFD were observed. In both fermentation systems $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations were lower ($P < 0.05$) for HF compared with HC diets, but no differences ($P > 0.110$) were observed in lactate concentrations.

The lack of FCR effect on VFA concentrations in sheep ($P = 0.668$) contrasts with the greater ($P = 0.010$) VFA concentrations observed for HC diets in the BC. There was a good agreement between BC and sheep in the interpretation of the effects of FCR on VFA profile and in both systems fermentation of HF diets resulted in greater ($P < 0.05$) proportions of acetate and acetate:propionate ratio, and lower ($P < 0.05$) proportions of butyrate, isovalerate and caproate, compared with the fermentation of HC diets.

Both fermentation systems detected similar differences attributable to forage type for most measured parameters. Diets containing alfalfa hay promoted higher ($P < 0.05$) apparent DMD, $\text{NH}_3\text{-N}$ and total VFA concentrations and proportions of butyrate, isobutyrate, isovalerate and valerate than those containing grass hay in both sheep and BC. Degradability of NDF tended to be higher ($P = 0.079$) for alfalfa hay-diets than for grass hay-diets in sheep, but no differences ($P = 0.678$) due to forage type were detected in BC.

There were differences between fermentation systems in the magnitude of most determined parameters. Values of pH were higher ($P < 0.001$) in BC than in sheep (0.37 and 0.47 units for HF and HC diets, respectively). Sheep had apparent DMD values lower ($P < 0.001$) than BC for both HF (0.502 and 0.574 g/g, respectively) and HC diets (0.471 and 0.617 g/g, respectively). For all diets, values of NDFD were between 1.55 and 1.69 times lower in BC than in sheep. Concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ in BC were between 1.63 to 3.02 times higher than in

vivo, whereas lactate and total VFA concentrations were 0.47 to 0.55 and 0.57 to 0.74 of those in vivo, respectively. Despite the differences in the magnitude of total VFA concentrations, there were significant relationships between *in vivo* values and those in BC (n = 16) for acetate (r = 0.831; $P < 0.001$), propionate (r = 0.647; $P = 0.007$) and butyrate (r = 0.582; $P = 0.018$) proportions and acetate:propionate ratio (r = 0.675; $P = 0.004$).

A total of 181 peaks were detected in the ARISA electropherograms across the full set of 32 samples, and the number of peaks in individual samples ranged from 75 to 94 in the inocula and from 65 to 90 in the BC samples. As shown in Table 4.2.3, the number of peaks and Shannon index in samples from BC were unaffected ($P = 0.165$ to 0.866) by FCR and forage type, but inocula from sheep fed diets with alfalfa hay had higher ($P = 0.030$) number of peaks and Shannon index than inocula from grass hay-fed sheep. The similarity index between the bacterial communities in the inocula and those in the corresponding BC was unaffected ($P > 0.05$) by the studied dietary factors.

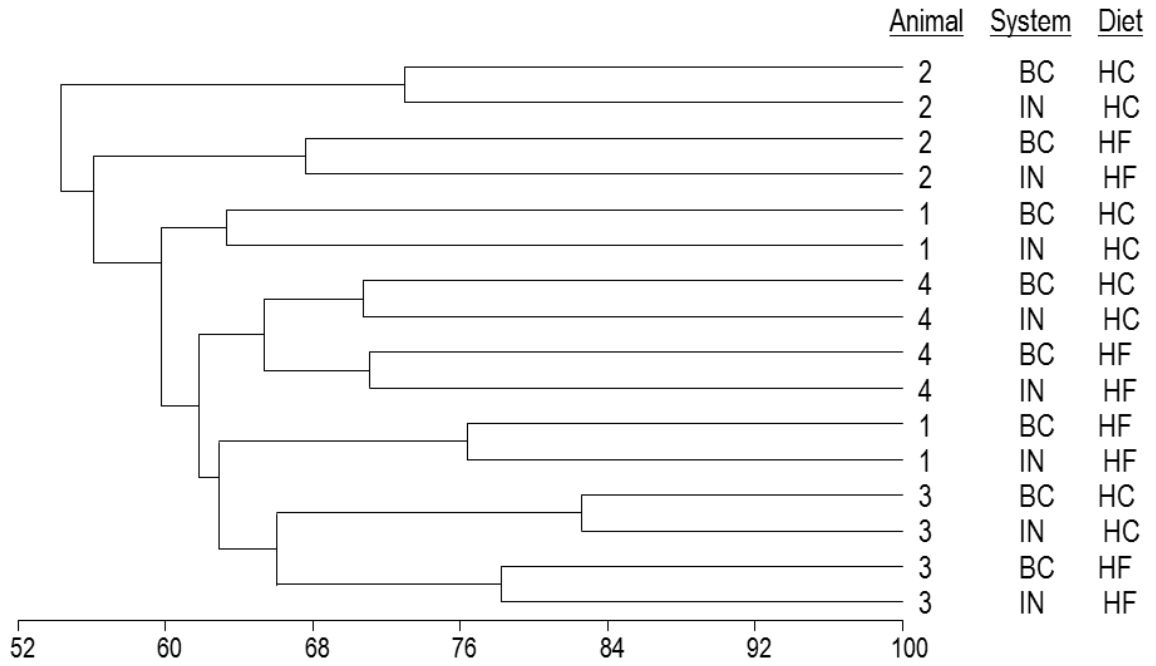
Table 4.2.3 Effect of forage:concentrate ratio (FCR) and type of forage on values of Shannon index and numbers of peaks detected in the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) electropherograms of samples from batch cultures of rumen microorganisms (BC) and from the sheep rumen fluid (IN) used to inoculate the BC, and similarity index (%) of ARISA profiles between BC and IN

Item	Diet ¹				SEM	P-value		
	HFA	HFG	HCA	HCG		FCR	Forage	FCR x Forage
Shannon index								
BC	4.41	4.35	4.39	4.39	0.019	0.725	0.185	0.205
IN	4.51	4.42	4.46	4.44	0.019	0.631	0.030	0.105
Number of peaks								
BC	82.5	78.3	80.8	80.5	1.42	0.866	0.165	0.209
IN	90.5	83.0	86.5	85.3	1.53	0.593	0.030	0.108
Similarity index BC-IN	74.7	67.2	71.9	71.9	1.98	0.662	0.111	0.110

¹HFA: 700 g of alfalfa hay/kg dry matter; HFG: 700 g of grass hay/kg dry matter; HCA: 300 g of alfalfa hay/kg dry matter; HCG: 300 g of grass hay/kg dry matter. The same concentrate was used in all diets.

Figures 4.2.1A and 4.2.1B show the dendrograms of the ARISA profiles of inocula and BC samples for diets containing alfalfa hay and grass hay, respectively. No clear clustering according fermentation system or FCR was observed, but for diets containing alfalfa hay samples from sheep 4 and 3 formed two clearly differentiated clusters; similarly, samples from sheep 2 clustered together in the dendrogram constructed for diets with grass hay.

A)



B)

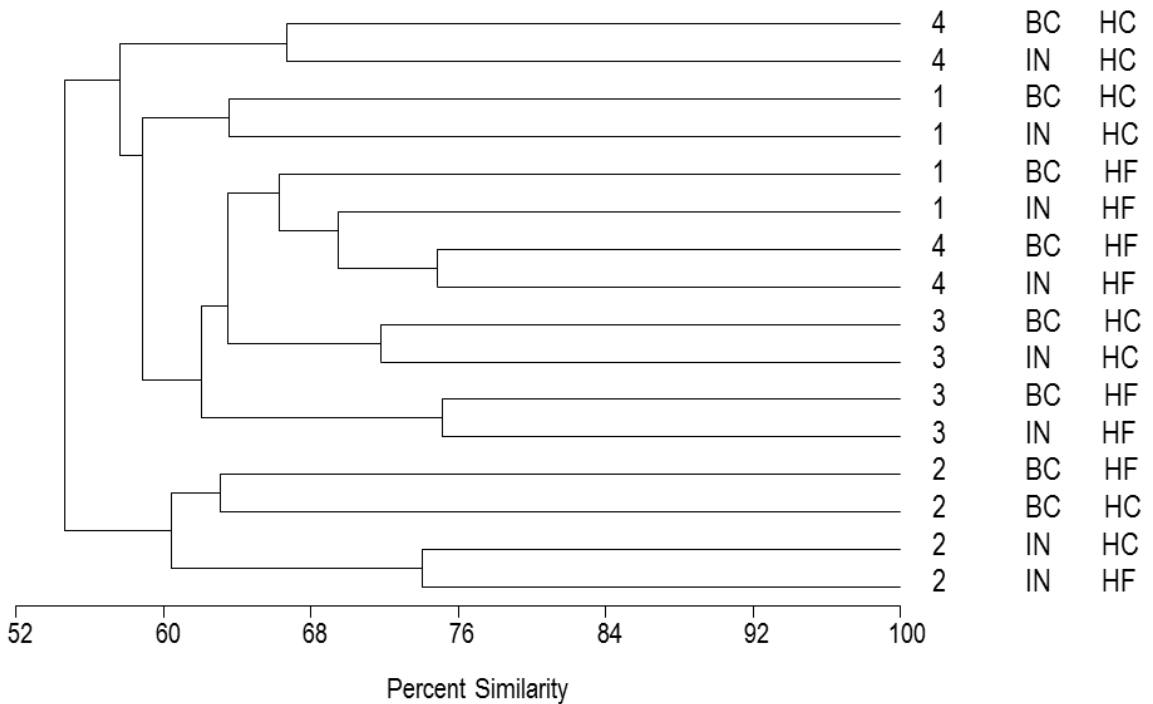


Figure 4.2.1 Dendrograms of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) profiles of bacterial communities in ruminal fluid from sheep used as inoculum (IN) and in batch cultures (BC) after 24 h of incubation for diets with either 700 (HC) or 300 (HF) of concentrate per kg DM and alfalfa hay (Fig. 1A) or grass hay (Fig. 1B) as forage. Numbers 1 to 4 correspond to individual sheep. In each case, sheep were fed the same diet incubated in the BC.

4.2.5 Discussion

The BC are frequently used to analyse rumen fermentation characteristics of different diets, and from a practical point of view it would be interesting to assess if they can detect differences between diets similar to those observed *in vivo*. Therefore, the effects of FCR and forage type on rumen parameters in BC were assessed, and the results were compared with those obtained in the sheep used as rumen fluid donors.

The lack of marked differences in pH between HF and HC diets observed in BC was partly due to the high buffer capacity of the buffer-mineral solution which prevented a pH drop in the BC with HC diets. Therefore, the pH decrease observed in sheep fed HC could not be reproduced in the BC, and this was also reflected in the greater *in vitro* pH values compared with those in sheep observed for all diets. Concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ in BC were higher than those *in vivo* and much higher than those usually observed in the rumen of animals fed similar diets (Mackie *et al.* 1978; Carro *et al.* 2000). This was possibly due to the use of a N-enriched buffer-mineral solution, but also to the lack of absorption in the BC. Mean values of $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations in the inocula used to fill the BC were 131, 105, 167 and 167 for HFA, HFG, HCA and HCG diets, respectively. In addition, it should be taken into account that the modified buffer-mineral solution of Goering & Van Soest (1970) used in this study supplied 84.11 mg of N per l in the form NH_4HCO_3 , which can be rapidly degraded to NH_3 by ruminal microorganisms. These results would indicate that reducing the amount of N in the buffer-mineral solution (i.e. NH_4HCO_3 being replaced by NaHCO_3) would help to achieve more physiological $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations in BC when incubating diets similar to those used in practical feeding of ruminants. In contrast, lactate concentrations were lower in BC than *in vivo*, which confirms previous studies (Tejido *et al.* 2005; Mateos *et al.* 2013). These results may suggest either lower lactate production or greater lactate utilization in BC compared with sheep, but

probably the high buffer capacity of the buffer-mineral solution prevented low pH values that might have stimulated the growth of lactate producers.

Absolute amounts of feed input and rumen digesta outflow are different in the *in vivo* and in the *in vitro* systems, and that can explain some of the observed differences in the magnitude of several measured parameters. The lower concentrations of total VFA in BC compared with the sheep rumen agree with previous observations (Rymer & Givens 2002; Brown *et al.* 2002) and was attributed to the lower feed/rumen fluid ratio in the BC (0.01; 0.4 g DM in 40 ml) than that *in vivo* (0.17; 1,184 g DM in an estimated rumen volume of 7000 ml; Ranilla *et al.* 1998). Moreover, dilution of ruminal fluid with the buffer-mineral solution before incubation also leads to a lower initial concentration of VFA in the BC. However, it should be also considered that VFA are removed from the rumen by absorption and flow to the lower tract, whereas there is no absorption or digesta flow in the BC. Despite the differences in the magnitude of total VFA concentrations, significant relationships between both measurements were observed for the main VFA proportions. This is in agreement with results of Rymer & Givens (2002), who also found significant relationships between the VFA pattern in BC and in the rumen of sheep fed 3 mixed diets. In contrast, Brown *et al.* (2002) reported no relationship between the VFA measured in BC and those in the rumen of steers fed 8 different forages. These authors attributed the lack of relationship to the use as inoculum for the BC trial of rumen fluid from a different animal species (sheep). In addition, the *in vivo* experiment was conducted with steers fed only forage, whereas the sheep donors of rumen fluid for the *in vitro* experiment were fed a mixed diet (600 g forage/kg and 400 g concentrate/kg).

The significant relationships observed in our study between *in vivo* and *in vitro* VFA profile would indicate a similar fermentation pattern in both systems, although in paired t-test comparisons acetate proportions were lower ($P < 0.001$) and those of propionate greater ($P = 0.002$) in BC than in sheep. As pointed out by

Rymer & Givens (2002), some differences between *in vitro* and *in vivo* fermentations can be partly explained by fibrolytic bacteria being more active *in vivo* versus *in vitro*. Manipulation of rumen contents for its use as inoculum inevitable implies a certain exposure to oxygen that reduces the viability of the fibrolytic bacteria (Russell & Wilson 1996). This would help to explain the lower acetate proportions in the BC, which is consistent with the lower ($P < 0.001$) NDFD observed in the *in vitro* system, as acetate is mainly produced from fermentation of structural carbohydrates. The higher concentrations of isovalerate ($P < 0.001$) and valerate ($P = 0.049$) in the BC than in sheep may also indicate a lower capture of these branched-chain VFA by the fibrolytic bacteria, as they use these VFA for the synthesis of essential amino acids, long chain fatty acids and aldehydes (Bryant 1973).

The similarity index between the bacterial communities in the IN and those in the corresponding BC ranged from 67.2 to 74.7% for the different diets. These values are similar to the 70.2% of similarity found by Prates *et al.* (2010) when comparing the bacterial communities' structure in semi-continuous BC with alfalfa hay as substrate after 24 h of incubation with that in the rumen fluid used as inoculum. These results would indicate that some changes in bacterial communities were produced over the incubation period. Different conditions in BC, such as the buffer capacity of the incubation medium, feeding rate (substrate/cultivation medium), digesta retention time, movements, etc., compared with the sheep rumen may have caused a selection of some bacterial strains. Given the wide range of bacteria inhabiting the rumen, it would be expected that some community members adapt well to the environmental conditions in BC, whereas others cannot grow under the same conditions. In accordance with this hypothesis, in paired Student's *t* test comparisons across diets both the number of peaks and Shannon index' values were lower ($P < 0.001$) in BC (79.3 and 4.37, respectively) than in the inocula (86.3 and 4.46), and 14 peaks appearing in the inocula samples were never detected in any BC sample.

When individual pairs of samples (inocula for each diet and sheep and its corresponding BC) were compared the number of peaks appearing in the inocula and not detected in BC ranged from 21 to 34, and this number was not affected ($P > 0.05$) by FCR (mean values of 28.8 and 26.5 for HF and HC diets, respectively), forage type (mean values of 26.6 and 28.6 for diets containing alfalfa and grass hay, respectively) or individual sheep (28.0, 26.5, 27.5 and 28.5 for sheep 1, 2, 3 and 4, respectively). These results seem to indicate that environmental conditions in BC were the main factors influencing transition of the bacterial communities, as diet characteristics and animal donor had no influence on the number of peaks in the inocula not appearing in the BC.

The cluster pattern observed in the dendrograms would indicate that sheep had a larger effect on bacterial communities than diet or fermentation system. Interestingly, in all cases each BC sample showed the highest similarity index with its corresponding inoculum, with the exception of samples from sheep 2 fed the diets containing grass hay. These results highlight the importance of using an inoculum from donors fed a diet similar to that being incubated in BC when conducting *in vitro* experiments.

In conclusion, although there were differences between sheep and BC in the magnitude of most parameters, differences between diets attributed to forage type in BC were similar to those in sheep for most of the measured parameters. However, there were discrepancies between *in vivo* and BC in the interpretation of the effects of FCR ratio on some parameters, such as pH, neutral-detergent fibre degradability and total VFA concentrations. The similarity in bacterial communities between the IN and BC was greater than 67% for all diets, but the lower bacterial diversity in BC compared with rumen fluid from sheep used as inoculum would indicate a selection of some bacterial strains over the incubation period. Studies identifying changes in specific microbial populations through the incubation period in BC would be helpful to understand the observed differences in fermentation parameters between *in vivo* and *in vitro* systems and might

contribute to improve *in vitro* fermentation systems. Moreover, reducing the NH_4HCO_3 concentration in the buffer-mineral solution would help to achieve more physiological $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations in batch cultures when incubating diets similar to those used in practical feeding of ruminants.

4.2.6 References

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1999). Official Methods of Analysis, 16th ed., 5th revision. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- BROWN, V.E., RYMER, C., AGNEW, R.E. & GIVENS, D.I. (2002). Relationship between *in vitro* gas production profiles of forages and *in vivo* rumen fermentation patterns in beef steers fed those forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 98, 13-24.
- BRYANT, M.P. (1973). Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. *Federation Proceedings* 32, 1809-1813.
- CARRO, M.D., LEBZIEN, P. & ROHR, K. (1992). Influence of yeast culture on the "*in vitro*" fermentation (Rusitec) of diets containing variable portions of concentrates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 37: 209-220.
- CARRO, M.D., VALDÉS, C., RANILLA, M.J. & GONZÁLEZ, J.S. (2000). Effect of forage to concentrate ratio in the diet on ruminal fermentation and digesta flow kinetics in sheep. *Animal Science* 70, 127-134.
- CZERKAWSKI, J.W. & BRECKENRIDGE, G. (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 38, 371-384.
- FAICHNEY, G. J. (1975). The use of markers to partition digestion within the gastrointestinal tract of ruminants. In *Digestion and Metabolism in the Ruminant* (Eds. A. C. I. Warner & I. W. McDonald), pp. 277-291. Armidale, New South Wales, Australia: University of New England Publishing Unit.
- GOERING, M.K. & VAN SOEST, P.J. (1970). Forage Fiber Analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). In *Agricultural Handbook*, n^o 379. Washington DC, USA: Agricultural Research Services, USDA.
- KIMBERLEY, A.C. & TAYLOR, C. (1996). A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 56, 49-58.
- MACKIE, R.I., GILCHRIST, F.M.C., ROBERTS, A.M., HANNAH, P.E. & SCHWARTZ, H. M. (1978). Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *Journal of Agricultural Science* 90, 241-254.

- MATEOS, I., RANILLA, M.J., TEJIDO, M.L., SARO, C., KAMEL, C. & CARRO, M.D. (2013). The influence of diet on the effectiveness of garlic oil and cinnamaldehyde to manipulate *in vitro* ruminal fermentation and methane production. *Animal Production Science* 53, 299-307.
- MOULD, F.L., KLIEM, K.E., MORGAN, R. & MAURICIO, R.M. (2005). *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 31-50.
- PRATES, A., DE OLIVEIRA, J.A., ABECIA, L. & FONDEVILA, M. (2010). Effects of preservation procedures of rumen inoculum on *in vitro* microbial diversity and fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 155, 186-193.
- RAMOS, S., TEJIDO, M.L., MARTÍNEZ, M.E., RANILLA, M.J. & CARRO, M.D. (2009a). Microbial protein synthesis, ruminal digestion, microbial populations, and nitrogen balance in sheep fed diets varying in forage-to-concentrate ratio and type of forage. *J. Anim. Sci.* 87, 2924-2934.
- RAMOS, S., TEJIDO, M.L., RANILLA, M.J., MARTÍNEZ, M.E., SARO, C. & CARRO, M.D. (2009b). Influence of detachment procedure and diet on recovery of solid-associated bacteria from sheep ruminal digesta and representativeness of bacterial isolates as assessed by automated ribosomal intergenic spacer analysis-polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* 92, 5659–5668.
- RANILLA, M.J., LÓPEZ, S., GIRÁLDEZ, F.J., VALDÉS, C. & CARRO, M.D. (1998). Comparative digestibility and digesta flow kinetics in two breeds of sheep. *Animal Science* 66, 389-396.
- RUSSELL, J.B. & WILSON, D.B. (1996). Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?. *J. Dairy Sci.* 79, 1503-1509.
- RYMER, C. & GIVENS, D.I. (2002). Relationships between patterns of rumen fermentation measured in sheep and *in situ* degradability and the *in vitro* gas production profile of the diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101, 31-44.
- SARO, C., RANILLA, M.J. & CARRO, M.D. (2012). Postprandial changes of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets varying in type of forage as monitored by real-time PCR and automated ribosomal intergenic spacer analysis. *J. Anim. Sci.* 90, 4487-4494.
- SAS (2012). SAS Institute Inc. SAS/STAT 12.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- TEJIDO, M.L., RANILLA, M.J., GARCÍA-MARTÍNEZ, R. & CARRO, M.D. (2005). *In vitro* microbial growth and rumen fermentation of different diets as affected by the addition of disodium malate. *Animal Science* 81, 31-38.
- VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B. & LEWIS, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.

- WARNER, A.C.I. (1956). Criteria for establishing the validity of *in vitro* studies with rumen micro-organisms in so-called artificial rumen systems. *Journal of General Microbiology* 14, 733-748.
- WEATHERBURN, M.W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* 39, 971-974
- YU, Z. & MORRISON, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques* 36, 808-812.
- ZIEMER, C.J., SHARP, R., STERN, M.D., COTTA, M.A., WHITEHEAD, T.R. & STAHL, D.A. (2000). Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S ribosomal RNA-targeted probes. *Environmental Microbiology* 1, 632-643.

4.3 Prueba 3. Influence of rumen contents' processing method on microbial populations in the fluid and subsequent *in vitro* fermentation of substrates of variable composition

Influence of rumen contents' processing method on microbial populations in the fluid and subsequent *in vitro* fermentation of substrates of variable composition

I. Mateos^a, M.J. Ranilla^{a,b}, M. Ramos^c, C. Saro^a, M.D. Carro^{*}

^a *Departamento de Producción Animal, Universidad de León, León, Spain*

^b *Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), León, Spain*

^c *Departamento de Producción Agraria, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain*

***Corresponding author**

E-mail address: mariadolores.carro@upm.es (M.D. Carro)

Anim. Feed Sci. Technol. (en evaluación)

Abbreviations: ARISA: automated ribosomal intergenic spacer analysis; FC: 1:1 forage:concentrate mixture; CCA: canonical correspondence analysis; FL: squeezed through four layers of cheesecloth and further filtration through a 100- μm nylon cloth; FOR: forage; PM: processing method; OTUs: operational taxonomic units; qPCR: quantitative PCR; SQ: squeezed through four layers of cheesecloth; ST: blended for 3 min at 230 rev min^{-1} in a Stomacher® before being squeezed through four layers of cheesecloth;

4.3.1 Abstract

The *in vitro* batch culture technique is being increasingly used to study rumen fermentation, but the results are affected by several factors, being the source of the inoculum one of the most relevant. This work was conducted to assess the effects of different processing methods (PM) of ruminal contents on microbial populations in the obtained fluid, and its influence on fermentation parameters when the fluid was used as inoculum for *in vitro* incubations. Rumen contents were obtained from 4 rumen-fistulated sheep fed a 2:1 alfalfa hay:concentrate diet and subjected to the following treatments: SQ: squeezed through four layers of cheesecloth; FL: SQ treatment and further filtration through a 100- μm nylon cloth; STO: blended for 3 min at 230 rev min^{-1} in a Stomacher® and further filtrations as in SQ. Microbial populations' abundance in the ruminal fluids and bacterial diversity were analysed by quantitative PCR (qPCR) and automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA), respectively. Three forages (alfalfa hay, grass hay and barley straw) were incubated *in vitro*, either alone or mixed with concentrate (1:1), using each of the ruminal fluids as inoculum. There were no differences between SQ and FL methods in any of the microbial populations analysed, but STO increased the relative abundance of *Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus albus* ($P < 0.05$) and decreased ($P < 0.05$) the concentration of protozoal DNA compared with SQ. Bacterial diversity was not affected ($P > 0.05$) by PM. There were no interactions ($P > 0.05$) between the PM and the

characteristics of the substrates for any of the fermentation parameters analysed. Compared with SQ, the STO method resulted in greater ($P < 0.05$) methane production and ammonia-N concentrations. After 24 h of incubation, the use of STO inoculum increased ($P < 0.05$) methane production and dry matter degradability compared with SQ, with no differences in the rest of the parameters. No differences between SQ and FL methods were detected in any parameter. The results show that stomaching the rumen contents prior to inoculation of *in vitro* cultures modified some microbial populations, but had only subtle effects on fermentation parameters.

Keywords: inoculum preparation, *in vitro* fermentation, rumen, microbial populations, qPCR, ARISA

4.3.2. Introduction

The *in vitro* batch culture technique is been increasingly used to study ruminal fermentation by incubating substrates in buffered rumen fluid and measuring the main fermentation parameters, such as the concentration of ammonia-N and the production of volatile fatty acid (VFA) and methane. However, *in vitro* fermentation characteristics are influenced by many factors such, as the source, activity and preservation method of the inoculum, characteristics of the incubated substrate, the incubation medium, the equipment used, among many others (Rymer et al., 2005; Mould et al., 2005; Yáñez-Rúiz et al., 2016). The diet of the donor animals and the sampling time of rumen contents have been identified as main factors affecting the fermentation characteristics in the *in vitro* batch culture technique (Mould et al., 2005; Martínez et al., 2010; Mateos et al., 2015), but other relevant factor influencing the microbial activity of the fluid used as inoculum is the processing method, as microbial populations differ between the solid and liquid phases of rumen contents. Some studies have analysed the effects of using different combinations of solid and liquid rumen contents as inoculum for *in vitro* incubations, but most of this work has focused on gas and

VFA production and results were contrasting. Lee et al. (2004) observed that using solid-associated bacteria as inoculum for *in vitro* incubations of different substrates increased both the parameters of gas production kinetics and VFA production compared with using an inoculum of only liquid-associated bacteria, but Rymer et al. (1999) and Bueno et al. (2005) found no effects of the inclusion of solid-associated bacteria in the inoculum. The research on the influence of the processing method of rumen contents on microbial populations in the obtained fluid is limited to bacterial and protozoal populations (Shensu et al., 1980; Mackie et al., 1983; Fliegerova et al., 2014), and there is no information on other microbial populations which play an important role in the fermentative process, such as fungi and methanogenic archaea. Moreover, to our knowledge the influence of the PM on both the microbial populations in the fluid and subsequent *in vitro* fermentation characteristics has not yet been addressed.

The aim of this study was to evaluate the effect of three different processing methods of rumen contents on the microbial populations (total and cellulolytic bacteria, protozoa, fungi and methanogenic archaea) and bacterial diversity in the fluid obtained, and to assess their influence on the *in vitro* fermentation characteristics when the fluid was used to inoculate batch cultures. Six substrates of variable composition were used as it is likely that some processing methods will have a greater influence than others on the *in vitro* fermentation of a feed. Our hypothesis was that the fermentation of fibrous substrates would be more affected by the inclusion of solid-associated bacteria in the inoculum than that of starchy substrates.

4.3.3 Material and methods

4.3.3.1 Donor animals and feeding

Four adult rumen-fistulated sheep (64.5 ± 2.10 kg body weight) were used as donors of ruminal contents. Animals were housed in individual pens with free

access to water and a mineral-vitamin mixture. Sheep were fed a 2:1 mixed diet of lucerne hay and a commercial concentrate at energy maintenance level (ARC, 1984) distributed in two equal meals. The diet contained 913, 168, 426 and 269 g of organic matter (OM), crude protein (CP), neutral detergent fibre (aNDF) and acid detergent fibre (ADF) per kg of dry matter (DM), respectively. Sheep management and rumen content withdrawal were carried out in accordance with the Spanish guidelines for experimental animal protection (Royal Decree 53/2013 of February 1st on the protection of animals used for experimentation or other scientific purposes) in line with the European regulations. All the experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of León.

4.3.3.2 Processing methods of ruminal digesta

The experimental treatments and *in vitro* incubations were conducted on four different days, and the rumen digesta of one sheep was used in each of them. Samples (mix of liquid and solid) from the dorsal, central and ventral regions of the rumen were collected from one sheep immediately before the morning feeding with a pair of tongs inserted through the rumen cannula to form one composited sample (about 600 g). Rumen contents were placed into thermos flasks pre-heated at 39°C by filling with hot water and transferred to the laboratory within 15 min. Rumen digesta was divided into three equal portions that were subjected to one of the following treatments: SQ: rumen contents were filtered through 4 layers of cheesecloth; FL: SQ treatment followed by filtration through a 100 µm pore size nylon bag; and STO: rumen contents were placed in Stomacher® standard bags and homogenized with a Stomacher® 400 Circulator (Seward Ltd., London, UK) for 3 min at 230 rpm and afterwards filtered through 4 layers of cheesecloth. The pH of the fluid was immediately measured with a pH-meter (Crison Basic 20, Crisson Instruments, Barcelona, Spain), 0.8 mL of fluid was added to 0.5 mL of deproteinizing solution (100 g metaphosphoric acid

and 0.6 g crotonic acid per L) for VFA analysis, 1 mL was added to 1 mL 0.5M HCl for ammonia-N determination, and 10 mL were immediately frozen and kept at -80°C until DNA extraction for qPCR and automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) analyses. The rest of the fluid was kept under continuous flushing with CO₂ and immediately used as inoculum for the *in vitro* incubations.

4.3.3.3 Substrates and *in vitro* incubations

Samples of three forages either alone (alfalfa hay, grass hay and barley straw) or mixed 1:1 with a commercial concentrate for dairy sheep were used as substrates for the *in vitro* incubations. The commercial concentrate was composed of barley, corn, soybean meal oat, full fat soya, lupin, oat, fullfat soybean, calcium carbonate, sugarcane molasses, salt, wheat middlings, dicalcium phosphate and mineral-vitamin premix in proportions of 392, 192, 142, 120, 75, 30, 13, 10.2, 7, 4.6, 4.2 and 10 g per kg, respectively, and contained (g/kg DM) 932, 203, 350, 143 and 25.5 g of organic matter, crude protein, aNDF, ADF and acid detergent lignin, respectively. Chemical composition of the forages and the forage:concentrate mixtures is shown in Table 4.3.1.

Table 4.3.1 Chemical composition (g/kg dry matter) of the substrates used in the *in vitro* incubations

Item	Forages ¹			Forage:concentrate mixtures ¹		
	AL	GR	BS	CAL	CGR	CBS
Organic matter	879	926	908	902	931	920
Crude protein	177	94.4	52.4	189	149	128
Neutral detergent fibre (aNDF)	455	616	754	381	487	552
Acid detergent fibre (ADF)	270	314	448	205	227	449
Acid detergent lignin (ADL)	81.1	52.3	60.8	49.5	39.5	42.9
ADL/aNDF (g/g)	0.178	0.087	0.081	0.130	0.085	0.078

¹ Substrates were alfalfa hay, grass hay and barley straw, either alone (AL, GR and BS, respectively) or mixed 1:1 with a commercial concentrate (CAL, CGR and CBS, respectively). The concentrate contained 932, 200, 350, 143 and 25.5 g of organic matter, crude protein, aNDF, ADF and ADL per kg of dry matter, respectively.

All substrates were ground to pass through a 1 mm mesh screen, dried (50°C for 48 h), and incubated with the inoculum obtained by treating the ruminal contents from each sheep by the three processing methods. Samples of each substrate (300 mg) were weighed into 120-mL serum bottles. Ruminal fluid from each sheep and processing method was mixed with the buffer solution of Goering and Van Soest (1970; no trypticase added) in a proportion 1:4 (mL/mL) at 39°C under continuous flushing with CO₂. Thirty ml of buffered rumen fluid were added into each bottle under CO₂ flushing. Bottles were sealed with rubber stoppers and aluminum caps and incubated at 39°C. A total of 48 bottles with substrate (two bottles for each substrate and inoculum) and 6 bottles without substrate (blanks; two for each inoculum) were incubated for each sheep. Incubation lasted for 8 h in half of the bottles (24 bottles with substrate and 3 blanks) and for 24 h in the other half. At each incubation time, total gas production was measured as described by Theodorou et al. (1994), using a pressure transducer (Delta Ohm DTP704-2BGI, Herter Instruments SL, Barcelona, Spain) and a calibrated syringe (Dismadel S.L., Madrid, Spain). The syringe plunger was withdrawn until the gas pressure in the head-space of the bottles was returned to ambient pressure, as indicated by a reading of zero on the visual display of the transducer. A gas sample (10 mL) was removed from each bottle and stored in an evacuated tube (Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium) for methane analysis. Bottles were then uncapped, the pH was measured immediately, and the fermentation was slowed down by swirling the bottles in iced water. Samples for VFA and ammonia-N analysis were taken as described before. Finally, the contents of the 24 h-incubation bottles were transferred to previously weighed filter crucibles, and the residue of incubation was washed with 50 mL of hot (50°C) distilled water. Crucibles were dried at 50°C until constant weight and weighed to calculate apparent DM degradability (DMD). The residue was analyzed for aNDF to calculate true DM degradability (TDMD; Van Soest et al., 1966).

4.3.3.4 Analytical procedures

Dry matter (ID 934.01), ash (ID 942.05) and N (ID 984.13) were determined according to the Association of Official Analytical Chemist (1999). aNDF and ADF analyses were carried out according to Van Soest et al. (1991) using an ANKOM220 Fibre Analyser unit (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA). Sodium sulfite and heat-stable amylase were used in analysis of aNDF and ADF, and they were expressed inclusive of residual ash. Ammonia-N concentration was determined by a modified colorimetric method (Weatherburn, 1967). Concentrations of VFA and methane were analyzed by gas chromatography following the procedures described by Carro and Ranilla (2003) and Martínez et al. (2010), respectively.

4.3.3.5 DNA extraction, qPCR and automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA)

To analyze the microbial communities in the ruminal fluids obtained after the different processing methods of ruminal digesta, samples of the ruminal fluid obtained were defrosted, 2 mL were centrifuged ($20,000 \times g$, 5 min, 4°C), and the pellets were used for DNA extraction. The pellets were treated with a MiniBeadbeater (3 min; Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) for mechanical disruption of the microorganisms. Total DNA was extracted in duplicate following the procedure described by Yu and Morrison (2004), with the exception that an additional step involving the treatment of samples with cetyltrimethylammonium bromide was included to remove PCR inhibitors. The QIAamp DNA Stool Mini Kit columns (QIAGEN, Valencia, CA) were used to purify the DNA. Eluted DNA concentration and absorbance ratios were measured in a Nanodrop ND-1000 (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE, USA).

Absolute quantification of total bacteria and protozoa was performed by qPCR using as standard DNA extracted from bacterial and protozoal pellets

previously isolated from the rumen of sheep as described by Saro et al. (2012). The cross-contamination of bacterial DNA in the protozoal DNA was measured by qPCR and subtracted from the concentration determined by spectrophotometry. The populations of *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, fungi and methanogenic archaea were determined by qPCR in relation to the total bacterial population. A full description of the primers used for general bacteria, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and fungi has been given by Denman and McSweeney (2006), and primers used for general protozoa, *R. albus* and methanogenic archaea have been described by Sylvester et al. (2004), Koike and Kobayashi (2001) and Denman et al. (2007), respectively. Amplification efficiencies for each primer pair were investigated by examining dilution series (from 10^{-1} to 10^{-5}) of a pooled DNA template in triplicate and plotting the observed Ct values against the logarithm of total DNA concentration. The qPCR was performed in triplicate using an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, UK) as described by Saro et al. (2012). Briefly, each PCR reaction mixture (20 μ l final volume) contained 10 μ L SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 0.9 μ l of 20 μ M each primer, 6.2 μ l of milli Q water and 2 μ l of extracted DNA. A no-template (sterile distilled water) negative control was loaded on each plate run to screen for possible contamination and dimer formation and to set background fluorescence for plate normalization.

For the ARISA technique, the DNA was amplified using universal bacterial primers 16S-1392F and 23S-125R as described by Saro et al. (2012). Thermocycling and ARISA technique were conducted in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) and a MegaBACE 500 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Bucks, United Kingdom), respectively. Peaks were identified by comparison with an internal size standard using the GeneMarker Software v1.80 (SoftGenetics, State College, PA, USA) and the presence/absence of the different peaks was considered to compare the electropherograms profiles by using a

(dis)similarity matrix. The Shannon's diversity index was used to evaluate the diversity of bacterial communities, and dendrograms were constructed using the percent similarity and unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) options in the MVSP v3.12d software (Kovach Computing Service, Anglesey, Wales, UK). Venn diagrams were constructed with the ARISA presence/absence data to represent the overlapping peaks. Canonical correspondence analysis (CCA) was used to investigate the relationships between the microbial composition of the ruminal fluids (ARISA profiles and microbial populations abundances) and some fermentation measurements after 8 h of incubation using the R package *vegan* (Oksanen et al., 2015), and the results of the analyses were visualized as ordination biplots. A Monte Carlo permutation test was used (R package *ade4*; Dray et al., 2007) to test the hypothesis that microbial composition was related to the fermentation measures.

4.3.3.6 Calculations and statistical analyses

F. succinogenes, *R. flavefaciens*, *R. albus*, fungi and methanogenic archaea DNA abundance was determined relatively to the absolute quantification of total bacteria as described by Pfaffl (2001) after correcting for differences in amplification efficiencies between the target and the reference (total bacteria).

Data were analyzed independently for each incubation time as a mixed model using the PROC MIXED of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). The statistical model included the processing method, forage, forage:concentrate ratio, and the interactions processing method x forage, processing method x forage:concentrate ratio, forage x forage:concentrate ratio and processing method x forage x forage:concentrate ratio as fixed effects, and sheep (incubation day) as a random effect. Effects were declared significant at $P \leq 0.05$, and P values between 0.05 and 0.10 were considered as trends.

4.3.4 Results

There were no effects of the processing method ($P = 0.17$ to 0.81) on the pH values and the concentrations of ammonia-N and total and individual VFA in the resulting ruminal fluids (results not shown).

4.3.4.1. Effects of processing methods on microbial populations in the ruminal fluid

Table 4.3.2 shows the microbial populations in the ruminal fluids obtained after applying the different processing methods to ruminal contents. There were differences ($P < 0.05$) between individual donors in all the analysed microbial populations. However, there were no differences between processing methods ($P = 0.11$ to 0.99) either in total bacterial DNA concentrations or in the relative abundance of *R. flavefaciens*, fungi and methanogenic archaea. Compared with SQ, the STO method increased ($P < 0.05$) the relative abundance of *F. succinogenes* and tended ($P < 0.010$) to increase that of *R. albus*, but decreased ($P < 0.05$) total protozoal DNA concentrations. There were no differences ($P > 0.05$) between the fluids obtained by SQ and FL methods in any microbial population. Bacterial diversity in the ruminal fluids, expressed as Shannon index and number of peaks in the ARISA electropherograms, was not affected ($P = 0.40$ and 0.38 , respectively) by the processing method.

Table 4.3.2 Influence of processing methods of ruminal digesta from sheep on total bacterial and protozoal DNA concentrations, the relative abundance of *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes*, fungal and methanogenic archaeal DNA in the fluid, and values of Shannon index and numbers of peaks detected in the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) electropherograms

Item	Treatment ¹			SEM	P value
	SQ	FL	STO		
Total bacterial DNA (µg DNA/mL)	40.5	43.3	49.5	2.55	0.11
Total protozoal DNA (µg DNA/mL)	4.00 ^b	2.72 ^{ab}	1.36 ^a	0.500	0.03
Relative abundance of ²					
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	0.382 ^a	0.386 ^a	0.481 ^b	0.0207	0.02
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	0.291	0.306	0.327	0.0138	0.26
<i>Ruminococcus albus</i>	0.723	0.644	1.165	0.1433	0.08
Fungi	0.0015	0.0014	0.0014	0.00035	0.99
Methanogenic archaea	0.252	0.285	0.264	0.0157	0.38
Bacterial diversity					
Shannon index	4.30	4.26	4.27	0.215	0.40
Number of peaks	74.0	71.0	71.8	1.46	0.38

^{a, b} Within each row, means with a different superscript differ ($P < 0.05$).

¹ SQ: squeeze through 4 layers of cheesecloth; FL: SQ treatment and further filtration by passing a 100 µm nylon cloth; STO: treatment with Stomacher[®] for 5 min at 230 rpm.

² Microbes DNA measured relative to total bacterial DNA. Values expressed as $10^2 \times 2^{-\Delta Ct}$

Figure 4.3.1 shows the dendrogram of the ARISA profiles of the bacterial communities in the obtained ruminal fluids. The samples clustered into four groups according to the donor sheep, and for sheep 1, 2 and 4 the SQ and FL samples subclustered with a similarity greater than 85%. In contrast, SQ and FL samples from sheep 3 had a similarity lower than 50%, and did not follow the same clustering pattern. As shown in the Venn diagrams (Figure 4.3.2), from the 112 ARISA peaks detected, 107 were present in at least one sample from each treatment, and only 3 peaks were only identified in samples from STO method. Forty peaks were shared by at least one sample of each sheep, whereas the rest were present in only one animal or shared by two or three animals.

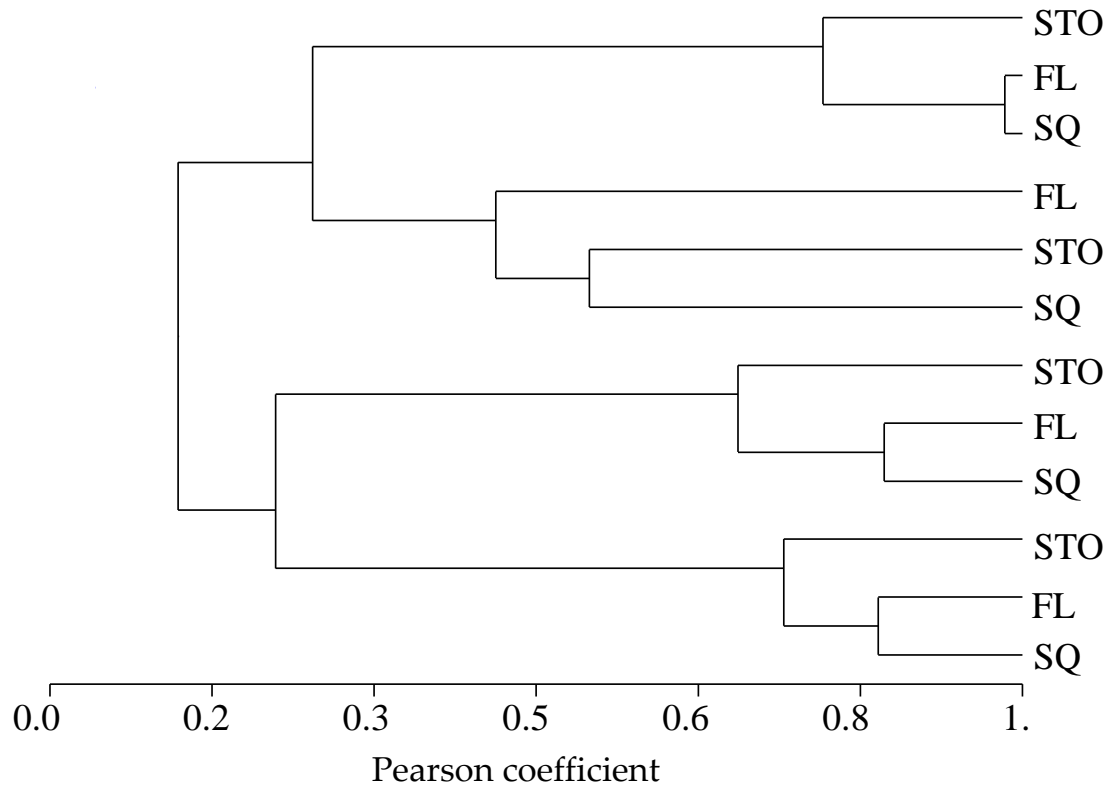
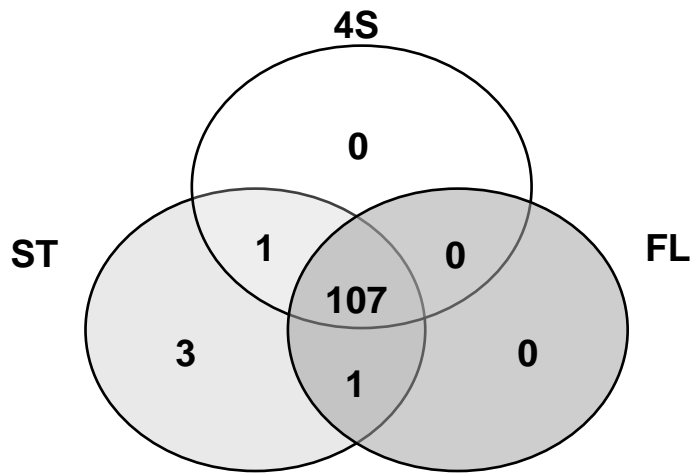


Figure 4.3.1 Dendrogram of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) profiles of bacterial communities in ruminal fluid from sheep obtained by squeezing ruminal contents through four layers of cheesecloth (SQ), further filtration of squeezed fluid through a 100 μm nylon cloth (FL), and treatment with Stomacher[®] for 3 min at 230 rpm before squeezing through four layers of cheesecloth (STO). Numbers 1 to 4 correspond to individual sheep.

A)



B)

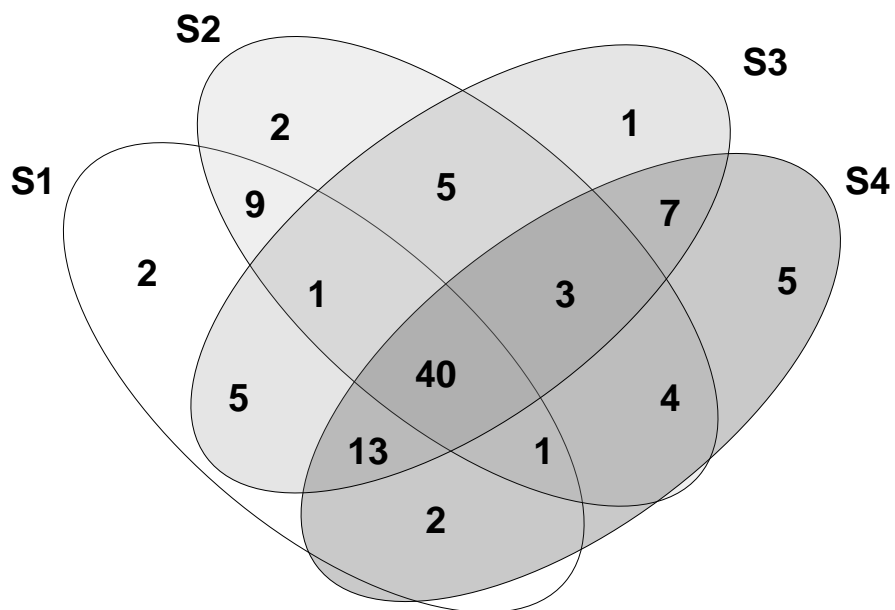


Figure 4.3.2 Venn diagrams showing the shared and unique peaks in the ARISA electropherograms of ruminal fluid samples obtained by the three treatments (SQ, FL and STO; Figure 2A) and of ruminal fluid samples from each of the four sheep used as donors (S1 to S4; Figure 2B).

4.3.4.2 Effects of processing methods on fermentation parameters

The pH values in the cultures ranged from 6.90 to 7.56 and from 6.75 to 7.00 at 8 and 24 h of incubation, respectively (values not shown), and were not affected by the processing method ($P = 0.41$ and 0.15 , respectively). The effects of the processing methods of ruminal contents on the *in vitro* fermentation parameters after 8 and 24 h of incubation are presented in Tables 4.3.3 and 4.3.4, respectively. All parameters ($P < 0.05$) were affected by the individual sheep (averaged values for individual animals not shown). No processing method \times forage, processing method \times forage:concentrate ratio, or processing method \times forage \times forage:concentrate ratio interactions ($P = 0.24$ to 0.96) were detected for any parameter measured. Total gas production after 8 h of incubation was not affected by the processing method ($P = 0.53$), but methane production was greater ($P < 0.05$) for STO compared with SQ method. The processing method of rumen contents did not influenced ($P = 0.28$ to 0.88) total or individual VFA production for any substrate after 8 h of incubation (Table 4.3.2), with the exception of isovalerate production, which was lower ($P < 0.05$) for STO than for SQ method. Using the STO inoculum resulted in increased ammonia-N concentrations ($P < 0.05$), compared with SQ and FL inoculum.

Table 4.3.3 Influence of processing methods to obtain rumen fluid (PM) on the fermentation parameters of substrates differing in their forage (FOR) and forage:concentrate ratio (FC) incubated *in vitro* for 8 h¹

Item	PM			FOR			FC			P value ²			
	SQ	FL	STO	AL	GR	BS	FOR	FC	SEM	PM	FOR	FC	FOR x FC
Gas (µmol)	1354	1377	1348	1662 ^c	1352 ^b	1066 ^a	1211	1509	46.8	0.53	<0.001	<0.001	<0.001
Methane (µmol)	191 ^a	201 ^{ab}	212 ^b	243 ^c	202 ^b	160 ^a	168	234	13.6	0.04	<0.001	<0.001	0.005
Total VFA (µmol)	560	566	571	784 ^c	528 ^b	380 ^a	501	627	35.5	0.28	<0.001	<0.001	<0.001
Individual VFA (µmol)													
Acetate	370	369	375	522 ^c	347 ^b	248 ^a	341	402	23.0	0.88	<0.001	<0.001	<0.001
Propionate	124	130	132	185 ^c	118 ^b	78 ^a	110	144	9.5	0.12	<0.001	<0.001	<0.001
Butyrate	49.8	51.1	47.6	55.3 ^b	49.3 ^{ab}	43.9 ^a	36.4	62.7	4.63	0.43	0.001	<0.001	0.04
Isobutyrate	4.19	4.00	4.36	5.15 ^b	3.80 ^a	3.60 ^a	3.59	4.78	0.414	0.33	<0.001	<0.001	0.004
Isovalerate	4.08 ^b	3.55 ^{ab}	3.31 ^a	4.18 ^b	2.99 ^a	3.77 ^b	2.83	4.47	0.450	0.02	0.001	<0.001	0.002
Valerate	7.32	7.77	7.57	11.9 ^b	5.70 ^a	5.06 ^a	6.77	8.33	0.792	0.62	<0.001	0.001	<0.001
Caproate	0.40	0.83	0.62	0.63	0.61	0.62	0.65	0.59	0.480	0.32	0.99	0.79	0.45
Acetate/propionate (mol/mol)	2.99	2.85	2.85	2.83 ^a	3.00 ^{ab}	3.21 ^b	3.12	2.81	0.243	0.12	0.006	<0.001	0.25
NH ₃ -N (mg/L)	134 ^a	133 ^a	141 ^b	140 ^b	126 ^a	142 ^b	131	141	4.8	0.01	<0.001	<0.001	0.02

^{a, b, c}: Within PM, FOR or FC means with different superscript differ (P<0.05)

¹ Ruminal fluid from sheep obtained by squeezing ruminal contents through four layers of cheesecloth (SQ), filtration of squeezed fluid through a 100 µm nylon cloth (FL), and treatment with Stomacher® for 3 min at 230 rpm (STO). Substrates were alfalfa hay (AL), grass hay (GR) and barley straw (BS) either alone (FOR) or mixed with concentrate at 50:50 (FC)

² No significant PM x FOR, PM x FC or PM x FOR x FC interactions were detected (P=0.24 to 0.96).

All fermentation parameters analysed after 8 h of incubation were affected ($P < 0.001$ to 0.006) by forage and forage:concentrate ratio, excepting caproate production. In addition, forage x forage:concentrate ratio interactions ($P < 0.001$ to 0.04) were detected for all parameters, with the exception of caproate production and acetate/propionate ratio. The substrates containing alfalfa hay produced the highest ($P < 0.05$) amount of gas, methane and total VFA, and those containing barley straw showed the lowest productions ($P < 0.05$). The ammonia-N concentration was lower ($P < 0.05$) for substrates containing grass hay than for those containing AL and BS. The proportion of forage in the substrate affected all fermentation parameters excepting caproate production, with substrates containing concentrate having greater ($P < 0.001$) productions of gas, methane and VFA (total and individual), but lower ($P = 0.02$) ammonia-N concentrations than forage substrates.

Similarly to that observed for the 8 h incubations, no processing method x forage, processing method x forage:concentrate ratio, or processing method x forage x forage:concentrate ratio interactions ($P = 0.18$ to 0.98) were detected for any parameter measured after 24 h of incubation (Table 4.3.4). The processing method of rumen contents did not affect the production of gas and of total and individual VFA. Using the STO inoculum resulted in increased ($P < 0.05$) methane production and DMD compared with SQ and FL inocula, but there were no effects of processing method on the ratio methane / DM degraded ($P = 0.49$) and ammonia-N concentrations ($P = 0.52$). The STO method also resulted in greater ($P < 0.05$) values of TDMD compared with those for SQ method.

Table 4.3.4 Influence of processing methods to obtain rumen fluid (PM) on the fermentation parameters of substrates differing in their forage (FOR) and forage:concentrate ratio (FC) incubated *in vitro* for 24 h¹

Item	PM			FOR			FC		SEM	P value ²			
	SQ	FL	STO	AL	GR	BS	FOR	FC		PM	FOR	FC	FOR x FC
Gas (µmol)	2254	2287	2285	2719 ^c	2249 ^b	1858 ^a	2024	2526	80.7	0.73	<0.001	<0.001	<0.001
Methane (µmol)	480 ^a	471 ^a	510 ^b	604 ^c	481 ^b	376 ^a	432	542	28.4	0.05	<0.001	<0.001	0.006
Total VFA (µmol)	956	989	988	1273 ^c	909 ^b	735 ^a	830	1115	60.0	0.27	<0.001	<0.001	<0.001
Individual VFA (µmol)													
Acetate	610	629	631	821 ^c	586 ^b	454 ^a	541	700	35.3	0.24	<0.001	<0.001	<0.001
Propionate	205	210	213	280 ^c	186 ^b	155 ^a	175	240	11.2	0.16	<0.001	<0.001	<0.001
Butyrate	92.9	101	95.7	111 ^b	94.1 ^a	84.7 ^a	72.0	121	8.99	0.31	<0.001	<0.001	0.15
Isobutyrate	12.0	11.8	12.5	14.3 ^b	10.7 ^a	10.9 ^a	10.5	13.4	0.67	0.12	<0.001	<0.001	<0.001
Isovalerate	16.5	16.3	16.9	19.5 ^b	14.9 ^a	15.3 ^a	14.5	18.7	1.18	0.56	<0.001	<0.001	<0.001
Valerate	16.9	17.7	16.5	24.1 ^c	14.6 ^b	12.4 ^a	15.0	19.1	0.88	0.12	<0.001	<0.001	<0.001
Caproate	2.70	2.81	2.35	2.75	2.76	2.34	2.23	3.01	0.647	0.45	0.44	0.01	0.75
Acetate/propionate (mol/mol)	3.00	3.03	2.98	2.94 ^a	3.15 ^b	2.97 ^{ab}	3.10	2.94	0.182	0.60	0.03	0.04	0.82
NH ₃ -N (mg/L)	198	201	204	225 ^b	186 ^a	192 ^a	186	216	8.6	0.52	<0.001	<0.001	0.05
DMD (g/100 g)	35.1 ^a	35.4 ^a	38.7 ^b	45.9 ^b	36.9 ^b	27.6 ^a	29.7	43.3	2.23	0.01	<0.001	<0.001	<0.001
TDMD (g/100 g)	49.0 ^a	49.6 ^{ab}	51.2 ^b	63.2 ^c	48.2 ^b	40.0 ^a	42.7	57.3	1.43	0.03	<0.001	<0.001	<0.001
Methane/DM degraded (mol/g)	3.21	3.14	3.31	3.14	3.33	3.19	3.35	3.08	0.224	0.49	0.58	0.03	0.09

a, b, c: Within PM, FOR or FC, means with different superscript differ (P<0.05)

¹ Ruminal fluid from sheep obtained by squeezing ruminal contents through four layers of cheesecloth (SQ), filtration of squeezed fluid through a 100 µm nylon cloth (FL), and treatment with Stomacher[®] for 3 min at 230 rpm (STO). Substrates were alfalfa hay (AL), grass hay (GR) and barley straw (BS) either alone (FOR) or mixed with concentrate at 50:50 (FC)

² No significant PM x FOR, PM x FC and PM x FOR x FC interactions were detected (P=0.18 to 0.98).

The forage source affected ($P < 0.001$ to 0.03) the ammonia-N concentration and the production of gas, methane, total VFA, and individual VFA (excepting caproate production), with values for alfalfa hay being significantly higher ($P < 0.05$) than those for grass hay and barley straw, but there was no difference among forages in the ratio methane / DM degraded ($P = 0.58$). All parameters analysed were affected by the forage:concentrate ratio, with forage substrates having lower ($P < 0.001$) ammonia-N concentrations and productions of gas, methane and total VFA, as well as lower ($P < 0.001$) DMD and TDMD values than substrates containing concentrate. In contrast, forage substrates had greater ($P = 0.03$) methane / DM degraded ratios than substrates containing concentrate.

Canonical correspondence analysis was used to assess the associations among either microbial populations abundances or ARISA profiles in the inoculum and ruminal fermentation measures at 8 h of incubation. The individual sheep had the largest influence on both microbial composition (Figure 4.3.3) and ARISA profile (data not shown). Samples spread out in the plot with no apparent ordination according processing method, but for all sheep, SQ and FL samples plotted closer to each other than STO samples, which is in accordance to the results shown in Table 4.3.2. As indicated by the length of the arrows, pH and methane production were the parameters with greater association to the pattern of variation in the microbial composition of the inoculum. The P values of the Monte Carlo permutation test ($P = 0.25$ and 0.33 for the 3 forages and for the forage and the substrates containing concentrate, respectively; RV coefficient of 0.180 and 0.137 , respectively) show that there was no correlation between the microbial populations determined in our study and the fermentation parameters. In contrast, when comparing the ARISA profiles and fermentation parameters the P values of the Monte Carlo permutation test were 0.003 (RV = 0.660) and 0.001 (RV = 0.710) for the 3 forages and for the forage and the substrates containing concentrate, respectively, indicating a relationship between bacterial diversity and fermentation parameters.

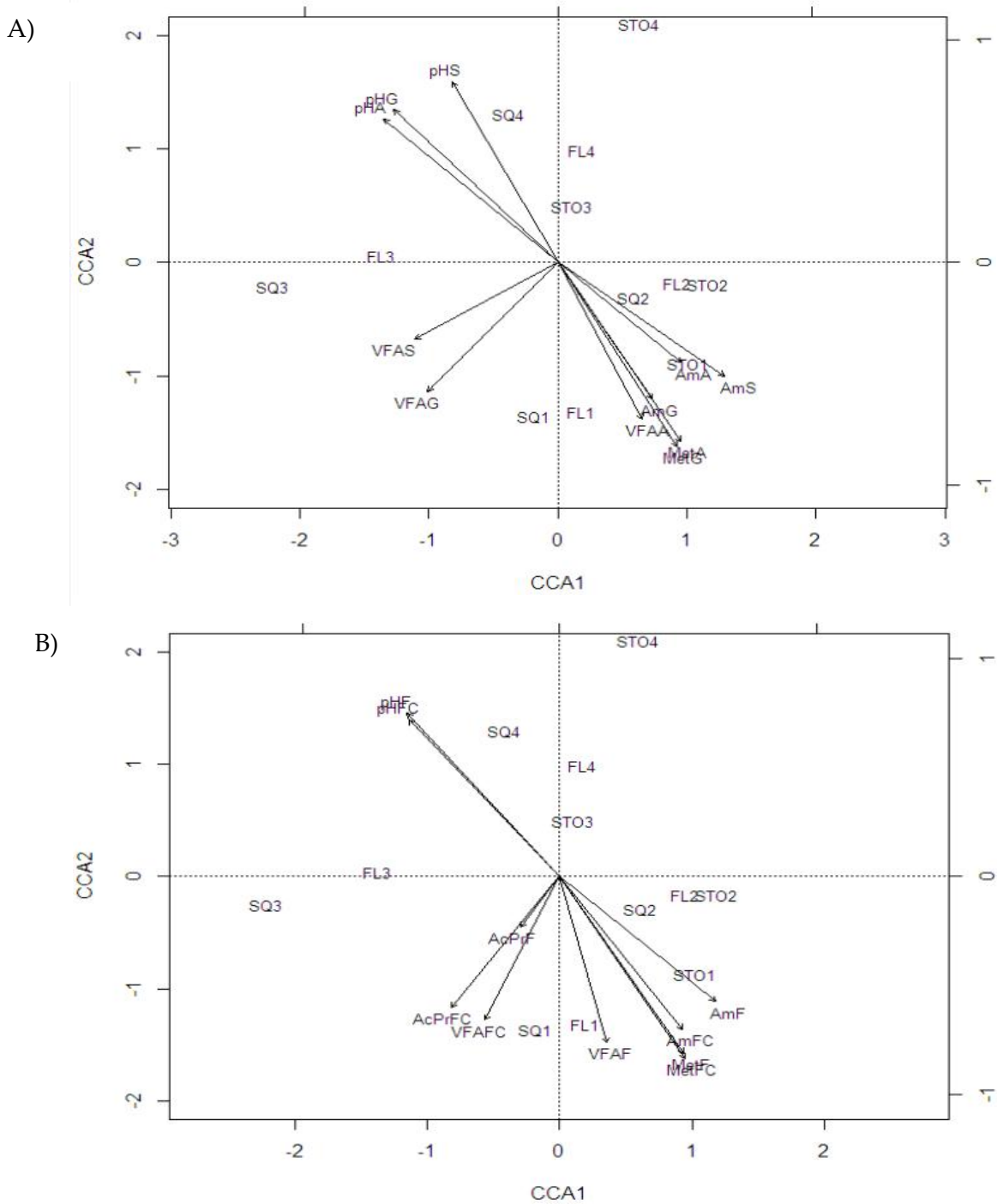


Figure 4.3.3 Canonical correspondence analysis (CCA) plot of microbial populations in the inoculum and fermentation parameters in 8 h-incubations of forages (A: alfalfa hay; G: grass hay; S: barley straw; Figure 3A) or substrates with different forage:concentrate ratio (F: 100% forage; FC: 50:50 forage:concentrate; Figure 3B), with arrows indicating increasing values of fermentation parameters. Each label corresponds to an individual inoculum obtained by squeezing ruminal contents through four layers of cheesecloth (SQ), filtration of squeezed fluid through a 100 μ m nylon cloth (FL) or treatment with Stomacher (STO), and numbers 1 to 4 correspond to individual sheep. Circles were drawn for helping in samples identification. AcPr: acetate:propionate ratio; Am: Ammonia-N; Met: CH₄; VFA: total VFA; Bac: Total bacteria; Prt: total protozoa; Arq: methanogenic archaea; Fs: *Fibrobacter succinogenes*; Rf: *Ruminococcus flavefaciens*; Ra: *Ruminococcus albus*.

4.3.5 Discussion

Three different processing methods were chosen for this study. The SQ method is widely used for *in vitro* incubations in batch cultures of mixed ruminal microorganisms (Yáñez-Rúiz et al., 2016), as it separates easily the solid and liquid phases of rumen digesta; however, the SQ inoculum can contain small feed particles with associated microorganisms that can influence the fermentation pattern. To avoid this effect a further filtration through a nylon cloth with a pore size of 100 μm was performed before *in vitro* incubation (FL method). Because a great proportion of the ruminal microorganisms can be attached to feed particles, especially in animals fed high-forage diets (Cheng et al., 1995; Yáñez-Rúiz et al., 2016), the STO method was selected due to its proven ability to detach solid-associated bacteria (Ramos et al., 2009a; Martínez et al., 2009). Our hypothesis was that including solid-associated bacteria in the inoculum would result in improved fermentation, especially for high-fiber substrates. To test this hypothesis we used substrates of variable composition, and determined the main fermentation parameters at 2 incubation times (8 and 24 h), as differences between substrates may decrease or even disappear with increasing incubation time (Kamel et al., 2008; Mateos et al., 2014). Previous studies have investigated the effects of the processing method of rumen contents on gas production profiles (Cone et al., 1996; Lee et al., 2004; Pell and Schofield, 1993) and fermentation parameters (Lee et al., 2004; Rymer et al., 1999; Senshu et al., 1980), but few have looked into the effects of processing method on rumen microbial composition (Mackie et al., 1983; Martínez et al., 2009; Ramos et al., 2009a) and to our knowledge none has addressed both of them.

The processing methods did not significantly affect total bacterial DNA concentration, but this value was 22.2% higher with STO method than with the control (SQ), which may have been due to a greater detachment of bacteria from the solid phase. In agreement with this hypothesis, Mackie et al. (1983) found that

the treatment of solid rumen digesta with Ultra-Turrax® or Stomacher® for 1 min almost doubled the counts of total culturable and lactate-utilizing bacteria compared with the counts obtained after manual swirling to suspend solid particles; in contrast, the counts of cellulolytic bacteria were decreased. The study of Mackie et al. (1983) was conducted on the basis of culture viability and the authors discussed that the poor anaerobiosis was responsible for at least some of the lethal action of the Ultra-Turrax® or Stomacher® treatments on cellulolytic bacteria. This effect could help to explain the lack of influence of the processing methods used in our study on most fermentation parameters, despite that the STO method resulted in greater amounts of *F. succinogenes* and *R. albus* and numerically greater amounts of bacteria. In fact, Mackie et al. (1983) conducted some experiments inside an anaerobic cabinet and observed that Ultra-Turrax® or Stomacher® treatments increased by 2-3 fold total culturable, lactate-utilizers and cellulolytic bacteria compared with the treatment consisting in manual swirling to suspend solid particles.

Previous studies have shown that stomaching the ruminal digesta has an impact on both the amount and profile of bacteria recovered in the fluid. Ramos et al. (2009a) and Martínez et al. (2009) compared different methods of detaching solid-associated bacteria from ruminal digesta from sheep and Rusitec fermenters, respectively. In both studies the treatment with Stomacher® for 5 min at 230 rpm detached a greater percentage of solid-associated bacteria (68.7%, averaged value) compared with either incubating the digesta with a solution of methylcellulose (54.4%) or freezing before treating with Stomacher® (62.6%). Based on these results, we decided to use the STO method in our study, but the treatment time was reduced to 3 min to decrease the oxygen exposure, and this may have reduced the amount of bacteria detached.

The relative abundance of *F. succinogenes* and *R. albus* was, respectively, 25.9 and 65.8% greater in STO than in SQ inoculum, but *R. flavefaciens* abundance was

not affected by the processing method. Kudo et al. (1987) observed that these cellulolytic species differ in the nature of both their attachment to cellulose and their enzymatic attack, which could explain the variable influence of the STO method observed on each species. *F. succinogenes* is a particularly important species for fiber digestion in the rumen, being metabolically active on less digestible fiber tissues (Koike and Kobayashi, 2009), and its greater abundance in STO inoculum could help to explain the observed increase in the DMD and TDMD of the substrates when they were incubated with this inoculum. Among the major cellulolytic communities, ruminococci are major contributors to H₂ production (Chaucheyras-Durand et al., 2010), and the greater proportion of *R. albus* in STO inoculum agrees with the higher methane production after 8 and 24 h of incubation. The lack of significant differences between SQ and FL inoculum in any of the microbial populations analysed might indicate that those associated to the small feed particles added with SQ inoculum did not represent a significant contribution to total microbial populations. The lack of differences between SQ and FL methods in any fermentation parameter is consistent with this hypothesis.

The numbers of ARISA peaks for the different treatments were similar to those previously reported in sheep using the same methodology (Ramos et al., 2009a; Saro et al., 2012; 2014). Neither the Shannon index nor the number of peaks were affected by the processing method, which indicates a similar diversity and number of identified operational taxonomic units (OTUs) in all inocula. However, bacterial structure was different among individual animals and processing methods, as indicated by the ARISA-bases dendrogram (Figure 4.3.1). For three of the four sheep, SQ and FL samples clustered together and showed more than 85% similarity, indicating that both inocula shared many OTUs. The lower similarity of STO samples to SQ and FL samples would indicate the presence of different OTUs in this inoculum, which may suggest that

stomaching the ruminal contents detached specific bacteria from the solid phase; however, there were only 3 peaks exclusive of STO method. The cluster pattern observed in the dendrogram of ARISA profiles indicates that sheep had the largest effect on bacterial communities, as previously reported by others in the rumen of sheep fed different diets (Saro et al., 2012; 2014; Mateos et al., 2015).

The processing method had a marked influence on total protozoal DNA concentrations, which were 1.5 and 2.9 times greater in the SQ than in FL and STO samples, respectively. The lower protozoal DNA concentration in FL inoculum was attributed to the retention of bigger protozoa (> 100 μm) in the nylon cloth used for the filtration. The STO inoculum had the lowest protozoal DNA concentration, which could be due to physical damage to the labile protozoa membrane, allowing the liberation and shearing of intracellular DNA during stomaching and its further loss during the centrifugation of the samples prior to DNA extraction. These results are in agreement with those of Mackie et al. (1983), who found out that stomaching ruminal contents for 1 min decreased the counts of ciliate protozoa by 2.3 fold compared with a treatment consisting in manual swirling to suspend solid particles and that all large holotrichs and entodiniomorphs (100-150 x 60-90 μm) were destroyed.

Despite of the observed shifts on microbial populations, the fermentation patterns of substrates differing in forage and forage:concentrate ratio after 8 or 24 h incubation were only slightly affected by the tested processing methods. The only differences between SQ and STO methods were detected in methane production, DMD and TDMD. In agreement with our results, Rymer et al. (1999) found that the gas production kinetics and VFA production and profile of a single forage were not significantly affected by stomaching the rumen contents for 20 seconds compared by squeezing the rumen contents through 4 layers of cheese-cloth, but stomaching significantly increased the organic matter apparent degradability of the substrate. Similarly, Bueno et al. (2005) observed that

including increasing proportions of solid-associated bacteria in the ruminal inoculum had no effect on the parameters of gas production kinetics of different feedstuffs commonly fed to ruminants in the tropics, but increased their organic matter apparent degradability. In contrast, Lee et al. (2004) observed that when using either only solid- or only liquid-associated bacteria as inoculum for 24 h-incubations of different substrates (grass silage, concentrate and a 60:40 mixture of silage and concentrate), both the parameters of gas production kinetics and VFA production were higher with the inoculum containing solid-associated bacteria. In our experiment, the SQ and FL inoculum contained mainly liquid associated bacteria, but STO inoculum likely contained some detached bacteria from solid phase, as indicated by the greater abundance of some cellulolytic bacteria. Whether the detached bacteria were responsible for the subtle differences observed in methane production and substrate degradation remains unclear. The processing of rumen contents for its use as inoculum implies the exposure of microorganisms to oxygen, and the likely increased exposure by stomaching may have counteracted the expected positive effect of including detached solid-associated bacteria in the inoculum on *in vitro* fermentation.

The lack of correlation between the microbial populations and fermentation parameters in the CCA analysis may be explained by the complexity of the rumen microbial ecosystem and the intricate interactions among microorganisms in the fermentative process. Moreover, it has to be noticed that both microbial populations and fermentation parameters were only slightly affected by the processing method in our study and this reduced the range of variation in the data, difficulting the detection of correlations among these measurements. In contrast, the ARISA analysis was able to identify subtle differences between processing methods, and the Monte Carlo permutation test revealed a correlation between the ARISA profile and the fermentation parameters. In agreement with these results, Hernandez-Sanabria et al. (2010) and Carberry et al. (2012)

observed that the bacterial structure, assessed by PCR-DGGE analysis, in the rumen of beef cattle was associated with fermentation parameters.

In cows fed diets with variable content of carbohydrates and protein, Belanche et al. (2012) analysed the correlations between the abundance of specific microbial groups and some fermentation parameters. In agreement with their results, the abundance of bacteria, protozoa and methanogenic archaea showed no significant correlation ($P > 0.05$) with total VFA production after 8 h of fermentation (results not shown), but Belanche et al. (2012) found a significant correlation between VFA concentrations and fungi abundance at 5 h after feeding that was not detected in our study. The abundance of *F. succinogenes* and *R. flavefaciens* in the inoculum was positive related ($P < 0.05$) to the amount of methane produced (for the 3 forages and for the forage and mixed substrates), which is consistent with both the greater abundance of methanogens and the greater methane production observed for STO compared with SQ and FL methods. The negative relationship ($P < 0.05$) between the abundance of *F. succinogenes* and *R. flavefaciens* in the inoculum and the pH after 8 h of incubation may reflect the greater fermentation (with associated lower pH values) produced by those inocula with greater abundances of these cellulolytic bacteria, as the range of pH values (from 6.90 to 7.56) were adequate for the growth of both of them. Finally, the lack of correlation between the abundance of methanogenic archaea and the production of methane observed in our study agrees well with the results previously reported in the literature (Abecia et al., 2012; Romero-Perez et al., 2014).

As expected, the characteristics of the substrate incubated (forage and forage:concentrate ratio) influenced the fermentation characteristics, but the lack of significant interactions between the processing method and the characteristics of the substrate indicates a similar response to processing methods across substrates. For most fermentation parameters, forage substrates ranked from

greater to smaller values as alfalfa hay > grass hay > barley straw, which is consistent with their chemical composition. In agreement with the results reported in the literature for fermentation patterns in sheep fed diets with different forage:concentrate ratios (Carro et al., 2000; Ramos et al., 2009b), the incubation of the substrates containing concentrate resulted in greater amounts of most fermentation products than that of forage substrates both at 8 and 24 h. The fermentation of the mixed substrates resulted in greater methane productions, but the amounts were lower when methane was expressed per unit of DM degraded.

4.3.6 Conclusion

The results of this experiment show that the tested method of processing the rumen contents to obtain fluid for *in vitro* incubations influenced the microbial populations present in the inoculum, but affected only slightly the fermentation of substrates of different chemical composition. Under the conditions of our study, stomaching the rumen contents did not affect the abundance of fungi and methanogenic archaea in the obtained fluid, but it increased the abundance of total and cellulolytic bacteria and decreased that of protozoa. Stomaching the rumen contents for its use as inoculum introduces an additional step in the procedure and increases the risk of exposing the microorganisms to oxygen, and the increased exposure by stomaching may have counteracted the positive effect of including detached solid-associated bacteria in the inoculum. Studies comparing stomaching the rumen contents inside and outside an anaerobic chamber are needed to confirm this hypothesis.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness under the Project AGL2011-22628. We would like to thank Dr. Benjamin Rabanal for his help with qPCR and ARISA analyses.

4.3.7 References

- Abecia, L., Toral, P.G., Martín-García, A.I., Martínez, G., Tomkins, N.W., Molina-Alcaide, E., Newbold, C.J., and Yáñez-Ruiz, D.R., 2012. Effect of bromochloromethane on methane emission, rumen fermentation pattern, milk yield, and fatty acid profile in lactating dairy goats. *J. Dairy Sci.* 95, 2027–2036.
- ARC. 1984. The nutrients requirements of ruminant livestock, Suppl. No. 1. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, UK.
- Association of Official Analytical Chemist, 1999. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- Belanche, A., Doreau, M., Edwards, J.E., Moorby, J.M., Pinloche, E., and Newbold, C.J., 2012. Shifts in the rumen microbiota due to the type of carbohydrate and level of protein ingested by dairy cattle are associated with changes in rumen fermentation. *J. Nutr.* 142, 1684–1692.
- Bueno, I.C.S., Cabral Filho, S.L.S., Gobbo, S.P., Louvandini, H., Vitti, D.M.S.S., Abdalla, A.L., 2005. Influence of inoculum source in a gas production method. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124, 95–105.
- Carberry, C.A., Kenny, D.A., Han, S., McCabe, M.S., and Waters, S.M., 2012. Effect of phenotypic residual feed intake and dietary forage content on the rumen microbial community of beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4949-4958.
- Carro, M.D., Ranilla, M.J., 2003. Influence of different concentrations of disodium fumarate on methane production and fermentation of concentrate feeds by rumen micro-organisms in vitro. *Br. J. Nutr.* 90, 617–623.
- Carro, M.D., Valdés, C., Ranilla, M.J., and González, J.S., 2000. Effect of forage to concentrate ratio in the diet on ruminal fermentation and digesta flow kinetics in sheep. *Anim. Sci.* 70, 127–134.
- Chaucheyras-Durand, F., Faqir, F., Ameilbonne, A., Rozand, C., Martin, C., 2010. Fates of acid-resistant and non-acid-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in ruminant digestive contents in the absence and presence of probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 640–647.
- Cheng, K.J., McAllister, T.A., and Costerton, J.W., 1995. Biofilms of the ruminant digestive tract. in: Lapin-Scott, H.M., Costerton, J.W. (Eds.), *Microbial Biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 221-232.
- Cone, J.W., van Gelder, A.H., Visscher, G.J.W., Oudshoorn, L., 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim. Feed Sci. Technol.* 61, 113–128.

- Denman, S.E., 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.
- Denman, S.E., Tomkins, N., 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.
- Dray, S., and Dufour, A.B., 2007: The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *J. Stat. Softw.* 22, 1-20.
- Fliegerova, K., Tapio, I., Bonin, A., Mrazek, J., Callegari, M.L., Bani, P., Bayat, A., Vilkki, J., Kopečný, J., Shingfield, K.J., Boyer, F., Coissac, E., Taberlet, P., Wallace, R.J., 2014. Effect of DNA extraction and sample preservation method on rumen bacterial population. *Anaerobe* 29, 80-84.
- Goering, H.K., Van Soest, P.J., 1970. Forage fiber analyses: apparatus, reagents, procedures, and some applications, in: *Agriculture Handbook*. Agricultural Research Service, U.S. Dept. of Agriculture, Washintong, DC, USA.
- Hernandez-Sanabria, E., Guan, L.L., Goonewardene, L.A., Li, M., Mujibi, D.F., Stothard, P., Moore, S.S., and Leon-Quintero, M.C., 2010. Correlation of particular bacterial PCR-denaturing gradient gel electrophoresis patterns with bovine ruminal fermentation parameters and feed efficiency traits. *Appl. Environm. Microbiol.* 76, 6338-6350.
- Kamel, C., Greathead, H.M.R., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., and Carro, M.D., 2008. Effect of allicin and diallyl disulfide on *in vitro* rumen fermentation of a mixed diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 351-363.
- Koike, S., Kobayashi, Y., 2009. Fibrolytic Rumen Bacteria: Their Ecology and Functions. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 22, 131–138.
- Koike, S., Kobayashi, Y., 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 361–366.
- Kudo, H., Cheng, K.J., and Costerton, J.W., 1987. Electron microscopic study of the methylcellulose-mediated detachment of cellulolytic rumen bacteria from cellulose fibers. *Can. J. Microbiol.* 33, 267-272.
- Lee, S.S., Chang, M.B., Ha, J.K., 2004. Effects of bacterial fraction and proportion of silage and concentrate on rumen fermentation and gas production profile. *Asian Australas. J. Anim. Sci* 17, 643–647.
- Mackie, R.I., J, T.J., C, G.F.M., M, N., 1983. Processing ruminal ingesta to release bacteria attached to feed particles. *South African J. Anim. Sci.* 13, 52-54.

- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Ramos, S., Tejido, M.L., Saro, C., Carro, M.D., 2009. Evaluation of procedures for detaching particle-associated microbes from forage and concentrate incubated in Rusitec fermenters: efficiency of recovery and representativeness of microbial isolates. *J. Anim. Sci.* 87, 2064–2072.
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Ramos, S. and Carro, M.D., 2010. The effect of the diet fed to donor sheep on *in vitro* methane production and ruminal fermentation of diets of variable composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 158, 126–135.
- Mateos, I., Ranilla, M.J., Saro, C., Díaz, A., and Carro, M.D., 2014. Influence of diet of donors and substrate characteristics on *in vitro* methane production at different incubation times. *Proc. Austr. Soc. Anim. Prod.* 30, 162 (Abstract).
- Mateos, I., Ranilla, M.J., Saro, C., Carro, M.D., 2015. Comparison of fermentation characteristics and bacterial diversity in the rumen of sheep and in batch cultures of rumen microorganisms. *J. Agric. Sci.* 1–10.
- Mould, F.L., Kliem, K.E., Morgan, R., and Mauricio, R.M. 2005. *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 31-50.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., and Wagner, H. 2015. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.3-2. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nuc. Acids Res.* 29, e45.
- Pell, A.N., Schofield, P., 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 76, 1063–1073.
- Ramos, S., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Martínez, M.E., Saro, C., Carro, M.D., 2009a. Influence of detachment procedure and diet on recovery of solid-associated bacteria from sheep ruminal digesta and representativeness of bacterial isolates as assessed by automated ribosomal intergenic spacer analysis-polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* 92, 5659–5668.
- Ramos, S., Tejido, M.L., Martínez, M.E., Ranilla, M.J., and Carro, M.D. 2009b. Microbial protein synthesis, ruminal digestion, microbial populations, and N balance in sheep fed diets varying in forage to concentrate ratio and type of forage. *J. Anim. Sci.* 87, 2924-2934.
- Romero-Perez, A., Okine, E.K., McGinn, S.M., Guan, L.L., Oba, M., Duval, S.M., Kindermann, M., and Beauchemin, K.A., 2014. The potential of 3-

- nitrooxypropanol to lower enteric methane emissions from beef cattle. *J. Anim. Sci.* 92, 4682–4693.
- Rymer, C., Huntington, J.A., Givens, D.I., 1999. Effects of inoculum preparation method and concentration, method of inoculation and pre-soaking the substrate on the gas production profile of high temperature dried grass. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78, 199–213.
- Rymer, C., Huntington, J.A., Williams, B.A., Givens, D.I., 2005. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 9-30.
- Saro, C., Ranilla, M.J., Carro, M.D., 2012. Postprandial changes of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets varying in type of forage as monitored by real-time PCR and automated ribosomal intergenic spacer analysis. *J. Anim. Sci.* 90, 4487–4494.
- Saro, C., Ranilla, M.J., Cifuentes, A., Rossello-Mora, R., Carro, M.D., 2014. Technical note: Comparison of automated ribosomal intergenic spacer analysis and denaturing gradient gel electrophoresis to assess bacterial diversity in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.* 92, 1083–1088.
- Senshu, T., Nakamura, K., Sawa, A., Miura, H., Matsumoto, T., 1980. Inoculum for In Vitro Rumen Fermentation and Composition of Volatile Fatty Acids. *J. Dairy Sci.* 63, 305–312.
- Sylvester, J.T., Karnati, S.K.R., Yu, Z.T., Morrison, M., 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.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.s., McAllan, A.B., 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.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.
- Van Soest, P.J., Wine, R.H., Moore, L.A., 1966. Estimation of the true digestibility of forages by the in vitro digestion of cell walls., In: 10th International Grassland Congress Proceedings. Helsinki.
- Weatherburn, M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39, 971–974.
- Yáñez-Ruiz, D.R., Bannink, A., Dijkstra, J., Kebreab, E., Morgavi, D.P., O’Kiely, P., Reynolds, C.K., Schwarm, A., Shingfield, K.J., Yu, Z., Hristov, A.N., 2016. Design, implementation and interpretation of in vitro batch culture

experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants—a review.
Anim. Feed Sci. Technol. (In press).

Yu, Z., Morrison, M., 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* 36, 808–812.

4.4 Prueba 4. Shifts in microbial populations developed in Rusitec fermenters over the incubation period differ between solid and liquid digesta phases and are influenced by diet

Shifts in microbial populations developed in Rusitec fermenters over the incubation period differ between solid and liquid digesta phases and are influenced by diet

Iván Mateos¹, María José Ranilla^{1,2}, Cristina Saro¹ and María Dolores Carro^{3*}

¹Departamento de Producción Animal, Universidad de León, León, Spain

²Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), León, Spain

³Departamento de Producción Agraria, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain

Running title: Microbial structure in Rusitec fermenters

*Correspondence: María Dolores Carro. mariadolores.carro@upm.es

Frontiers (en evaluación)

Abstract: Rusitec fermenters are *in vitro* systems widely used to study ruminal fermentation, but little is known about the microbial populations establishing in them. This experiment was designed to assess the time evolution of microbial populations in fermenters fed medium- (MC; 50:50 alfalfa hay:concentrate) and high-concentrate (HC; 15:85 barley straw:concentrate) diets. Samples from solid (SOL) and liquid (LIQ) content of fermenters were taken immediately before feeding on days 3, 8 and 14 of incubation for qPCR and ARISA analyses. In SOL, total bacterial DNA concentration and relative abundance of *Ruminococcus flavefaciens* remained unchanged over the incubation period, protozoal DNA concentration and abundance of *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and fungi decreased, whereas abundance of methanogenic archaea increased. In LIQ, total bacterial DNA concentration increased with time, and concentration of protozoal DNA and abundance of methanogens and fungi decreased. Diet x time interactions were observed for bacterial and protozoal DNA and relative abundance of *F. succinogenes* and *R. albus* in SOL, as well as for protozoal DNA in LIQ. Bacterial diversity in SOL increased with time, with no changes in LIQ. There were dietary differences in all microbial populations, with the exception of total bacteria and fungi abundance in LIQ. Bacterial diversity was higher in MC-fed than in HC-fed fermenters in SOL, but no differences were detected in LIQ. Values of pH, daily production of volatile fatty acids and CH₄ and isobutyrate proportions remained stable over the incubation period, but other fermentation parameters varied with time. The relationships among microbial populations and fermentation parameters were in well agreement with those reported in *in vivo* studies. Fermentation parameters remained fairly unchanged from day 8 to 14, but shifts in microbial populations were detected, which highlights the complex interactions between diet and rumen microbes. Using ¹⁵N as a microbial marker or rDNA sequences for estimating microbial protein synthesis offered similar results for diet comparison, but both methods presented contrasting results for

microbial growth in SOL and LIQ. Studies sampling the fermenters' contents at different times after feeding are needed to better characterize the temporal evolution of microbes in Rusitec fermenters.

Keywords: Rusitec fermenters, microbial populations, bacterial diversity, qPCR, ARISA

4.4.1 Introduction

Fermenters are *in vitro* systems widely used to study ruminal fermentation reducing the difficulties and ethical problems of working with fistulated animals. These systems are extensively used for different purposes, as reflected by a meta-analysis of variability in fermenters conducted by Hristov et al. (2012) using 1,074 experimental treatments from data published in refereed journals in the last years. Several types of ruminal fermenters have been described in the literature, but two of the most commonly used are the continuous-culture (CC) fermenters designed by Hoover et al. (1976) and the semi-continuous flow Rusitec system developed by Czerkawski and Breckenridge (1977). Both of them are run over periods of several days or even weeks, and quantitative and qualitative changes in the microbial populations through the incubation period are therefore likely. Several studies (Ziemer et al., 2000; Soto et al., 2012, 2013; Martínez-Fernández et al., 2015) have monitored the changes in microbial populations in CC fermenters using molecular techniques, but to our knowledge there is no information on this topic in Rusitec fermenters, although a decrease in protozoa numbers in the liquid phase have been constantly reported (Carro et al. 1995; 2009; Martínez et al., 2011a). The two types of fermenters have several functional differences, such as dilution rate, solids retention time, amount of feed delivered daily, frequency of feeding, and others that affect the fermentation characteristics (Fraser et al.,

2007; Carro et al., 2009) and consequently differences in the microbial populations developed in each type of fermenter are also expected. Moreover, microbial populations vary with changes in the composition of the incubated feed, and the operating conditions of the fermenters may have a variable influence on the microbes depending on the type of feed.

Studies comparing *in vivo* fermentation patterns with those in Rusitec fermenters are limited, but some studies in sheep have revealed significant differences, especially when high-concentrate diets were fed (Carro et al., 2009; Martínez et al. 2010a). Some of the discrepancies were attributed to the lack of absorption in fermenters, differences in fluid dilution rate, solid retention time and feed/volume ratio, and the way of operation of Rusitec fermenters. As stated by Castillejos et al. (2007) the adaptation of the ruminal microbiota to *in vitro* conditions is critical to ensure that observed effects are due to the experimental treatments and not to the adjustment of microbiota to the new environment conditions. However, to our knowledge no previous study has investigated this topic in Rusitec fermenters. Because diet is a major factor in determining rumen community structure and fermentation characteristics, the objective of this study was to assess the evolution of microbial populations (bacteria, protozoa, fungi and methanogenic archaea) and fermentation characteristics over the incubation period in Rusitec fermenters fed two contrasting diets. A second objective was to compare values of microbial growth determined using ^{15}N as an external marker with concentrations of microbial DNA in the fermenters to assess if both procedures detected similar differences between diets.

4.4.2 Materials and methods

4.4.2.1 Animals and diets

Six rumen-cannulated Merino sheep (57.4 ± 2.95 kg of body weight) were used as ruminal fluid donors for the *in vitro* incubations in a cross-over experimental

design with two periods of 30 days each. Sheep management and rumen content withdrawal were carried out in accordance with the Spanish guidelines for experimental animal protection (Royal Decree 1201/2005 of October 10 on the protection of animals used for experimentation or other scientific purposes) in line with the European Convention for the Protection of Vertebrates used for Experimental and other Scientific Purposes (European Directive 86/609). Experimental protocols were approved by the León University Institutional Animal Care and Use Committee.

Three sheep were fed a diet composed (on dry matter (DM) basis) of 50% of alfalfa hay and 50% of a commercial concentrate for dairy sheep (medium-concentrate diet; MC) and the other 3 received a diet based on 15% of barley straw and 85% of a concentrate for fattening lambs (high-concentrate; HC). Diets were formulated to be representative of those fed to dairy animals (MC) and to growing ruminants under intensive systems of production (HC). The dairy concentrate was based on barley, corn, soybean meal, lupin, oat, full fat soybean, sugarcane molasses, wheat flour, calcium carbonate, NaCl, dicalcium phosphate, calcium soap and mineral/vitamin premix in the proportions of 39.2, 19.2, 14.2, 12.0, 7.50, 3.00, 1.00, 0.46, 1.30, 0.70, 0.42, 0.02 and 1%, respectively (DM basis), whereas the fattening concentrate contained barley, corn, soybean meal, calcium carbonate, NaCl and mineral/vitamin premix in the proportions of 50.0, 30.3, 17.5, 0.79, 0.44 and 1.0%, respectively (DM basis). The MC diet contained (DM basis) 93.5% organic matter (OM), 18.6% crude protein (CP), 36.8% neutral detergent fiber (NDF), 16.2% acid detergent fiber (ADF), 2.62% ether extract and 35.9% non-fibrous carbohydrates, and HC diet contained 94.2% OM, 15.0% CP, 25.2% NDF, 9.52% ADF, 2.30% ether extract and 51.7% non-fibrous carbohydrates. Both diets were fed twice daily (09:00 and 18:00 h) at a daily rate of 52 g dry matter (DM)/kg body weight^{0.75} to minimize feed selection. Sheep were gradually adapted to the corresponding diet for 2 weeks before starting the *in vitro* incubations.

4.4.2.2 Rusitec incubations, sampling and chemical analyses

Two identical 14-d incubation runs were carried out using 4 Rusitec fermenters (500 ml effective volume) in a cross-over design. The general incubation procedure was as described by Martínez et al. (2010a) and in each run 2 fermenters received each of the diets. On the first day of each incubation run, each fermenter was inoculated with 250 ml of strained rumen fluid, 200 ml of artificial saliva, and 80 g of solid rumen content supplied into a nylon bag. Ruminant contents (liquid and solid) from each sheep were collected immediately before the morning feeding, mixed by diet, strained through 2 layers of cheesecloth, and transferred to the corresponding fermenters within 30 min of collection. The liquid flow through fermenters was maintained by continuous infusion of artificial saliva (McDougall, 1948) at a rate of 740 ml/d (dilution rate of 5.14%/h). Each fermenter received daily 30 g of DM of the corresponding diet. Alfalfa hay and barley straw were chopped (approximately at 0.5-cm pieces), and both concentrates were ground through a 3-mm sieve. Forage and concentrate were fed once daily (10:00 h) into separate nylon bags (100 µm pore; 8 x 15 cm), which were incubated for 48 and 24 h, respectively. Dilution rate and solids retention time were chosen to resemble values previously observed *in vivo* in sheep (Ranilla et al., 1997, 1998). Each fermenter was flushed daily with 2 l of N before and after feeding to remove gases produced during the fermentation and the air introduced in the fermenter during feeding, respectively. Liquid effluent was collected daily in flasks containing a solution of H₂SO₄ (20%; vol/vol) to maintain pH below 2. On day 13 a water solution saturated with HgCl₂ (5 ml) was added (replacing the H₂SO₄ solution that could cause bacterial lysis) to the effluent containers, which were held in an iced water bath to impede microbial growth.

On days 3, 8 and 14 of incubation, the pH of the fluid of each fermenter was determined immediately before feeding and the following samples were

collected. Three ml of fluid from each fermenter were taken into a sterile container and immediately frozen at -80°C for DNA extraction and 3 ml were frozen (-80°C) for determination of amylase and xylanase activities as described by Giraldo et al. (2007). Five ml of effluent were added to 3 ml of deproteinizing solution (10% of metaphosphoric acid and 0.06% crotonic acid; wt/vol) for volatile fatty acid (VFA) determination, and 5 ml of effluent were stored at -20°C for ammonia-N and total lactate determinations following the procedures described in Martínez et al. (2010a). The two nylon bags (1 with forage and 1 with concentrate) collected from each fermenter were washed twice with 40 ml of fermenter liquid and the washing fluid was returned to the fermenter. Bags were then opened and their content was transferred to a sterile container and weighed. The content was thoroughly mixed, about 5 g were frozen at -80°C for DNA extraction and 10 g were dried at 105°C in a forced-air oven for determination of DM content. Finally, the gas produced each day was collected and analyzed for CH_4 concentration by gas chromatography as described by Martínez et al. (2010b). Sampling days were selected because Rusitec trials have commonly an 8-day adaptation period and day 14 was the end of the incubation. Sampling on day 3 was chosen because previous studies have evidenced a dramatic change in fermentation parameters over the first incubation days in Rusitec fermenters (Martínez et al., 2011b).

From day 10 to 14, a solution of $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ was added to the artificial saliva at a rate of 4.0 mg of ^{15}N per g of dietary N for measuring microbial growth. Approximately 500 ml of the effluent collected on day 14 were used for the isolation of liquid-associated bacteria as described by Martínez et al. (2010c) and the rest of the effluent was freeze-dried for DM determination and ^{15}N enrichment analysis. The contents of nylon bags removed on day 14 were processed as described before, samples for DNA extraction were taken and the remaining content was used for DM determination, ^{15}N enrichment analysis and

isolation of solid-digesta associated bacteria as described by Martínez et al. (2010c).

4.4.2.3 Extraction of DNA, qPCR and Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA)

DNA was isolated in triplicate from centrifuged liquid samples (1 ml, 20000 x g, 5 min, 4°C) and lyophilized solid digesta samples (200 mg DM) after mechanical disruption of microorganisms with a MiniBeadbeater (3 min; Biospec Products, Bartlesville, OK, USA). The DNA was extracted following the procedure described by Yu and Morrison (2004) with the exception that an additional step involving the treatment of samples with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was included to remove PCR inhibitors (Saro et al., 2012), and the QIAamp DNA Stool Mini Kit columns (QIAGEN, Valencia, CA, USA) were used to purify the DNA. Absorbance ratios (A₂₆₀:A₂₈₀) of eluted DNA were measured in a Nanodrop ND-1000 (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE) to assess the quality of DNA.

Absolute quantification of total bacteria and protozoa was performed by qPCR using as standard DNA extracted from bacterial and protozoal pellets previously isolated from the rumen of sheep as described by Saro et al. (2012). The cross-contamination of bacterial DNA in the protozoal DNA was measured by qPCR, and subtracted from the concentration determined by spectrophotometry. The populations of *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, fungi and methanogenic archaea were determined by qPCR in relation to the total bacterial population. The qPCR assay for total bacteria, archaea and the 3 cellulolytic bacteria targeted partial sequences of the 16S rRNA gene, whereas that for fungi and protozoa targeted partial sequences of the 18S rRNA gene. A full description of the primers used for general bacteria, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and fungi has been given by Denman and McSweeney (2006) and primers used for general protozoa, *R. albus*

and methanogenic archaea have been described by Sylvester et al. (2004), Koike and Kobayashi (2001) and Denman et al. (2007), respectively. Amplification efficiencies for each primer pair were investigated by examining dilution series (from 10^{-1} to 10^{-5}) of a pooled DNA template in triplicate and plotting the observed Ct values against the logarithm of total DNA concentration. The qPCR was performed in triplicate using an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, UK) as previously described (Saro et al., 2014a). Briefly, each PCR reaction mixture (20 μ l final volume) contained 10 μ L SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 0.9 μ l of 20 μ M each primer, 6.2 μ l of milli Q water and 2 μ l of extracted DNA. A no-template (sterile distilled water) negative control was loaded on each plate run to screen for possible contamination and dimer formation and to set background fluorescence for plate normalization. Total bacteria qPCR analyses were conducted in 2 plates (one for liquid digesta samples and 1 for solid digesta samples), and protozoal qPCR analyses were conducted in 2 different plates (one for each digesta phase samples). Additional plates were run, and in each of them the 3 DNA samples from solid digesta of the same fermenter were assessed with primers for total bacteria, *F. succinogenes*, *R. flavofaciens*, *R. albus*, methanogenic archaea and fungi to calculate the relative abundance of each specific DNA relative to total bacterial DNA. Samples of liquid digesta were similarly analyzed for total bacteria, protozoa, methanogenic archaea and fungi.

For ARISA analyses, the DNA was amplified using universal bacterial primers 16S-1392F and 23S-125R as described by Saro et al. (2012). Thermocycling and ARISA technique were conducted in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) and a MegaBACE 500 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Bucks, United Kingdom), respectively (Saro et al., 2012). Peaks were identified by comparison with an internal size standard using the GeneMarker Software v1.80 (SoftGenetics, State College, PA, USA) and the

presence/absence of the different peaks was considered to compare the electropherograms profiles by using a (dis)similarity matrix. A principal coordinates analysis (PCoA) of the Bray–Curtis dissimilarities between samples was used to visualize differences among groups of samples was conducted using the R environment and R package *vegan* (Oksanen et al., 2015). The Shannon's diversity index was calculated to evaluate the diversity of bacterial communities, and dendrograms were constructed using the Pearson coefficient and the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) options in the MVSP v3.12d software (Kovach Computing Service, Anglesey, Wales, UK). Finally, to identify correlations among microbial populations and fermentation measurements, the associations among all variables showed in Tables 4.4.1 and 4.4.3 were investigated by principal component analysis (PCA). PCA analysis was conducted independently for SOL and LIQ samples using the R environment (2015).

4.4.2.4 Calculations and statistical analyses

F. succinogenes, *R. flavefaciens*, *R. albus*, fungi and methanogenic archaea DNA concentrations were determined relatively to the absolute quantification of total bacteria as $2^{-(Cq_{\text{target}} - Cq_{\text{total bacteria}})}$, where Cq represents the threshold cycle after correcting for differences in amplification efficiencies between the target and the reference (total bacteria).

Calculations for determination of microbial growth in each digesta phase of Rusitec fermenters using ^{15}N as a marker are described in Martínez et al. (2010a). Total microbial growth was calculated as the sum of the daily microbial growth in the solid and liquid phases of the fermenters. Microbial growth was also estimated as the sum of bacterial DNA plus protozoal DNA in both solid and liquid digesta.

Data were analyzed independently for each digesta phase as a mixed model with repeated measures using the MIXED procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). The statistical model used included diet, incubation run, time and diet × time as fixed effects, and fermenter as a random effect. Effects were declared significant at $P < 0.05$, and $P < 0.10$ was considered a trend. Data on microbial growth were analyzed independently for each method (^{15}N and total DNA) as a mixed model which included diet, digesta phase, incubation run, and diet × digesta phase time as fixed effects, and fermenter as a random effect. Effects were declared significant at $P < 0.05$, and $P < 0.10$ was considered a trend.

Correlations between values of microbial growth determined by using ^{15}N or rDNA sequences were assessed by Pearson correlation analysis using the PROC CORR of SAS.

4.4.4 Results

4.4.4.1 Microbial populations and bacterial diversity

Most of the microbial populations analyzed varied with the incubation time ($P < 0.05$), but diet × time interactions (either significant or a trend) were detected for all variables, with the exception of the relative abundance of *R. flavefaciens* and fungi in SOL and methanogenic archaea and fungi in LIQ (Table 4.4.1). Concentrations of total protozoa DNA and the relative abundance of fungi decreased with advancing time in both digesta phases ($P = 0.024$ to < 0.001). In contrast, total bacterial DNA concentrations in LIQ and the relative abundance of methanogenic archaea in SOL increased with incubation time ($P < 0.001$ and 0.021 , respectively). Total bacterial DNA concentrations and abundance of *R. flavefaciens* remained unchanged ($P = 0.224$ and 0.722 , respectively) over the incubation period in SOL.

The incubated diet affected ($P < 0.05$) all determined microbial populations, with the exception of total bacteria ($P = 0.998$) in LIQ and fungi abundance in

LIQ, although a trend ($P = 0.086$) to lower values for the MC diet than for the HC diet was observed for this last population. Compared to HC-fed fermenters, the fermenters receiving the MC diet had greater ($P < 0.05$) concentrations of total bacterial and protozoal DNA and abundance of the 3 fibrolytic bacteria and methanogenic archaea in SOL, as well as greater total protozoal DNA and abundance of methanogenic archaea in LIQ, but lower ($P < 0.05$) abundances of fungi in both digesta phases.

A total of 90 peaks were detected in the ARISA electropherograms across the full set of 56 samples, from which 6 were only identified in MC-fed fermenters and 4 only in fermenters fed the HC diet. As shown in Table 4.4.2, both the number of peaks and Shannon index in the SOL phase were higher ($P < 0.001$) in MC-fed fermenters compared with those receiving the HC diet, which would indicate a greater bacterial diversity promoted by the MC diet. In contrast, no differences ($P > 0.05$) between diets in bacterial diversity were observed in the LIQ phase, although the diet \times time interaction tended to be significant for both Shannon index and number of peaks ($P = 0.069$ and 0.071 , respectively). Whereas the Shannon index and number of peaks in SOL were greater on days 8 and 14 post-incubation than on day 3, bacterial diversity in LIQ remained unchanged ($P > 0.05$) over the incubation period. For both diets, the similarity index between SOL and LIQ phases increased ($P < 0.05$) from day 3 to day 8, but recovered initial values by the end of the incubation period.

The principal coordinates analysis plot of bacterial community (Figure 4.4.1) segregated samples by component 2 into two groups corresponding to diet regardless of sampling time. Twenty-two out of the 24 samples from the fermenters receiving the MC diet grouped below axis 2, whereas 16 samples from the HC-fed fermenters were above. Within each group, samples tended to group by sampling day, although this pattern was only evident for inocula samples and fermenters' samples taken on day 3. Percentages of variance explained by the

principal coordinates 1 and 2 were 28.53 and 12.42%, respectively. Based on these results, separate dendrograms were constructed for samples from MC and HC fermenters. Samples from MC-fermenters formed 3 clear clusters according to sampling day, and samples from day 3 subclustered further according digesta phase (SOL and LIQ; Figure 4.4.2A); however, no clear pattern of subclustering according digesta phase or fermenter was observed for samples taken on days 8 and 14. As shown in Figure 4.4.2B, samples from HC-fermenters grouped according incubation run, with all samples from fermenters 3 and 4 (first incubation run) forming a cluster and those from fermenters 1 and 2 (second incubation run) grouping together in a different cluster. Within each cluster, samples from day 3 formed a subcluster with samples from SOL and LIQ grouping further. Similarly to that observed for MC-fermenters, no clear clustering pattern could be established for samples from days 8 and 14. For both diets, inocula samples formed a separated cluster and subclustered further according digesta phase (SOL and LIQ).

4.4.4.2 Fermentation parameters and relationships with microbial populations

As shown in Table 4.4.3, values of pH, daily production of VFA and CH₄ and molar proportions of isobutyrate remained stable over the incubation period ($P = 0.345$ to 0.985), but the rest of the fermentation parameters varied with time. Molar proportions of acetate and propionate, lactate concentrations and enzymatic activities (amylase and xylanase) decreased ($P < 0.05$) from day 3 to the end of the incubation, whereas an increase ($P < 0.05$) with time was observed for molar proportions of butyrate, isovalerate, valerate and caproate and acetate:propionate ratio. Significant diet \times time interactions ($P < 0.05$) were detected for the proportions of acetate, propionate, butyrate and valerate, and xylanase activity, and a trend ($P < 0.10$) was observed for acetate:propionate ratio, ammonia-N concentrations and amylase activity. As expected, the incubated diet had a marked influence on the fermentation parameters. Compared with the MC

diet, the fermentation of the HC diet resulted in lower ($P < 0.001$) pH values, proportions of isoacids and valerate, acetate:propionate ratios and ammonia-N concentrations, but greater propionate and caproate proportions ($P < 0.001$), lactate concentrations ($P = 0.015$) and amylase activity ($P < 0.001$).

The PCA in Figure 4.4.3 shows how samples from different fermenters grouped according to the abundance of microbial populations and fermentation parameters for each digesta phase. The direction of each arrow indicates an increasing value of that variable and the angle between the arrows indicates the degree to which they are correlated. The magnitude of the arrows determines the importance of that variable to classify the samples. Samples taken on day 3 were clearly distinct from those taken on days 8 and 14, which largely clustered into their respective groups in SOL (Figure 4.4.3A), but showed some overlap in LIQ (Figure 4.4.3B). Samples from SOL and LIQ taken on day 3 from HC-fermenters were related with higher propionate proportions, amylase activity and lactate concentrations, whereas those from MC-fermenters were related to greater protozoa and butyrate proportions. For both SOL and LIQ, samples taken on days 8 and 14 from HC-fermenters were related to higher caproate proportions, and those from MC-fermenters were related to greater valerate and isovalerate proportions. The SOL samples from MC-fermenters taken on day 3 were related to greater protozoal DNA concentrations and abundances of the three cellulolytic bacteria.

4.4.4.3 Daily microbial growth

Values of daily microbial growth in each fermenter phase determined either using ^{15}N as a microbial marker or based on microbial rDNA quantification are shown in Table 4.4.4. There were no diet \times digesta phase interactions for any estimation method ($P = 0.146$ to 0.949). With both ^{15}N and total DNA, the MC diet promoted greater ($P < 0.001$ and 0.013 , respectively) microbial growth than the

HC diet, but there were no differences ($P = 0.509$) between diets in the bacterial DNA. Whereas the use of ^{15}N revealed greater ($P = 0.004$) microbial growth in SOL compared with LIQ, the opposite was found for total microbial DNA and bacterial DNA ($P < 0.001$). There were no relationship between the values of microbial growth obtained with ^{15}N and the amount of total DNA (bacterial plus protozoal) in each fermenter ($r = 0.521$; $P = 0.186$; $n = 8$), but a trend was observed when only values in LIQ were considered ($r = 0.620$; $P = 0.100$; $n = 8$).

4.4.5 Discussion

To our best knowledge this is the first study assessing the evolution of microbial populations and bacterial diversity over the incubation period in Rusitec fermenters fed different diets, although others have analyzed the microbial shifts in CC fermenters and results have been inconsistent. This inconsistency can be due to multiple factors such as the inoculum source, the operation conditions of the fermenters (pH, liquid dilution rate, solid retention time, etc.) and the type of diet among others.

In agreement with our results, a decline over time in protozoa has been observed in studies with CC fermenters (Muetzel et al., 2009; Soto et al., 2013; Martínez-Fernández et al., 2015). A decline of protozoa numbers with increasing incubation time has also been consistently reported in the LIQ phase of Rusitec fermenters (Carro et al., 1992, 1995; Martínez et al., 2010c, 2011a), but our results likewise show a decrease of protozoa in the SOL phase. Moreover, there was a significant correlation between the concentrations of protozoal DNA in the SOL and the LIQ phase of the fermenters ($r = 0.844$; $P < 0.001$; $n = 24$). Protozoal DNA concentrations were reduced from day 3 to 14 by 9.9 and 5.7 times for SOL and LIQ with the MC diet and by 64.1 and 11.5 times with the HC diet, respectively. These values are consistent with the 5.8 and 12.1-fold reductions in protozoa numbers (assessed by microscopic enumeration) in the LIQ phase of Rusitec

fermenters fed high-forage and high-concentrate diets, respectively, reported by Martínez et al. (2011a) over a 16-day incubation period. The lower pH in the HC-fermenters (Table 4.4.3) probably contributed to their reduced protozoa population, as protozoa numbers have been shown to decrease at pH values below 6.0 both *in vivo* (Franzolin and Dehority, 1996) and *in vitro* (Carro et al., 1995; Martínez et al., 2011a). The shorter retention time of the whole SOL digesta in the HC-fermenters (48 h for forage and 24 h for concentrate; 85% and 50% of concentrate for HC and MC diets, respectively) could also contribute to the reduced protozoa concentrations in this digesta phase, because the sequestration of protozoa among particulate digesta has been identified as an important factor in maintaining their concentration (Nakamura and Kurihara, 1978).

Contrary to that observed for protozoa, bacterial DNA concentrations increased with incubation time in both digesta phases in MC-fermenters and in the LIQ of HC-fermenters. Ziemer et al. (2000) and Soto et al. (2013) also observed a 1.7-fold and 1.2-fold increase in bacterial abundance in CC fermenters over 10 and 5 days of incubation, respectively, whereas Muetzel et al. (2009) and Soto et al. (2012) reported no temporal changes in bacterial abundance in CC fermenters fed diets of variable composition and inoculated with dairy cows' and goats' rumen content, respectively. Martínez-Fernández et al. (2015) observed a significant decrease in bacterial DNA concentrations from day 0 to day 4 of incubation in CC fermenters inoculated with goats' ruminal content, but concentrations remained stable afterwards until day 12. In Rusitec fermenters inoculated with sheep' ruminal content, Prevot et al. (1994) observed that fluorescence counts of bacteria in LIQ dropped markedly during the first 2 days of incubation, but remained fairly stable afterwards until the end of the 6-day incubation period. As previously discussed, differences in the source of the inoculum, the operation conditions of the fermenters and the type of diet can help to explain the variability of these results.

The 3 fibrolytic populations analyzed showed a different evolution with incubation time; whereas on day 3 *F. succinogenes* was the most abundant in all fermenters, by the end of the incubation *R. albus* was the most abundant in MC-fermenters and *F. succinogenes* in HC-fermenters. This was due to a decrease with time in the relative abundance of *F. succinogenes* for both diets with no concomitant change in *R. albus* abundance in MC-fermenters; in contrast, *R. albus* decreased in HC-fermenters. A fairly stable population of *F. succinogenes* in CC has been observed by Ziemer et al. (2000), Muetzel et al. (2009) and Soto et al. (2012), although Soto et al. (2013) reported a 17.5-fold increase by day 5 of incubation. *F. succinogenes* has been identified as the most abundant cellulolytic bacteria, irrespective of dietary conditions, in sheep rumen (Michalet-Doreau et al., 2001; Saro et al., 2012, 2014a) and in batch cultures inoculated with sheep ruminal fluid (Chen et al., 2008), and our results on day 3 are in good agreement. However, the conditions in MC-fermenters seem to have been more favorable for the growth of both *Ruminococcus*, whose abundances remained quite stable, than for *F. succinogenes*; in contrast, the abundance of the 3 cellulolytic bacteria decreased with time in HC-fermenters, which probably was partly due to the low pH values in these fermenters (Table 4.4.3).

A relatively stable population of methanogens over the incubation period has been repeatedly observed in CC fermenters (Ziemer et al., 2000; Soto et al., 2012, 2013; Martínez-Fernández et al., 2015). In contrast, we observed an increase in the relative abundance of methanogens in SOL with increasing time, indicating that the conditions inside the nylon bags containing the feed were appropriate for their growth. Although the population of methanogens is influenced by many factors (Belanche et al., 2014), some species have doubling times shorter than 5 h (Thauer et al., 2008) and therefore the long retention times of SOL in Rusitec fermenters (24 and 48 h for concentrate and forage, respectively) would favor their growth. Hailan et al. (2014) confirmed the rapid growth of methanogens

inside nylon bags containing forage after incubating *in situ* samples of switchgrass in the rumen of a dairy cow and observed that the abundance of methanogens at 4 h post-incubation increased 3.3 times compared to 30 min of incubation. In contrast to that observed in SOL, the abundance of methanogens in the LIQ tended to decrease over the incubation period for both diets. A factor likely to contribute to the loss of methanogens and other microbes in LIQ is the daily opening of the Rusitec fermenters to change the bags containing the feed. As a consequence, fermenters' contents are exposed to atmospheric oxygen, which is toxic for anaerobic microbes. Methanogens cannot sustain oxygen stress for a prolonged period of time and their growth has been shown to be markedly affected by the presence of oxygen (Tholen et al., 2007). The lower abundances of methanogens in the SOL and LIQ phases of HC-fermenters than in MC-fermenters may be pH-related, as pH values in MC-fermenters were in the range of optimum values for ruminal methanogenesis but those in HC-fermenters were below (Van Kessel and Russell, 1996). The lower methane production in HC-fermenters than in MC-fermenters supports this hypothesis (Table 4.4.3).

The decrease in the relative abundance of fungi in both digesta phases observed in our study is in contrast with the 1.5-fold and 23.2-fold increase observed by Soto et al. (2012) and Soto et al. (2013) in CC fermenters over the first 7 and 5 days of incubation, respectively. Kostyukovsky et al. (1995) observed that the number of fungal CFU in the LIQ of defaunated Rusitec fermenters decreased after inoculation, but recovered afterwards to values slightly lower than those in the inoculum; however, the inoculum was frozen at -20°C for 3 weeks before the inoculation of fermenters and therefore the results are not directly comparable with the present study. The greater fungi abundance in HC-fermenters than in MC-fermenters was unexpected and is contrary to the general idea that high-fiber diets should promote larger fungal-populations than diets low in fiber due to the relevant role that fungi have in fiber degradation. However, several studies

reported no differences in fungal abundances between diets with variable fiber content either in CC fermenters (Soto et al., 2012) or *in vivo* (Carberry et al., 2012). It has to be remembered that because Rusitec fermenters are opened daily to change the feed-containing bag, samples from SOL and LIQ phases were taken immediately before feeding. Previous *in vivo* studies (Saro et al., 2012; 2014a) have reported diurnal changes in fungal populations after feeding, detecting significant diet x time relative to feeding interactions. It is possible that the sampling time of our study had influenced the results, and studies with different sampling times after feeding are needed to better characterize the temporal evolution of microbes in Rusitec fermenters.

The number of peaks in the ARISA electropherograms ranged from 22 to 47 for MC diet and from 19 to 45 for HC diet, the values being similar to those previously reported for Rusitec fermenters (Martínez et al., 2010c). Bacterial diversity in SOL increased with incubation time for both diets, whereas it remained unchanged in the LIQ phase of the fermenters. In contrast, Soto et al. (2012, 2013) reported no temporary variations in bacterial diversity in the content of CC fermenters (SOL and LIQ mixed) assessed by DGGE or T-RFLP. The dendrograms in Figure 4.4.2 clearly show changes in bacterial diversity over the incubation period in our study. It is worth to notice that samples from MC-fermenters grouped according sampling day independently of the incubation run (2 identical runs were conducted), but samples from HC-fermenters separated in two groups according incubation run, which was attributed to a greater individual variability in the bacterial populations when sheep were fed the HC diet than when fed the MC diet. For both diets the inoculum samples formed a separated cluster, indicating that bacterial populations markedly changed after inoculation of fermenters. Inoculum samples subclustered according digesta phase, confirming the results from previous results showing differences in

bacterial diversity between SOL and LIQ phases of the rumen of sheep (Michalet-Doreau et al., 2001; Saro et al., 2014b).

The greater bacterial diversity observed in the SOL phase of MC-fermenters compared with HC-fermenters agrees well with the results of Martínez et al. (2010c) using ARISA and Larue et al. (2005) using T-RFLP, both reporting greater bacterial diversity in SOL ruminal digesta of sheep fed high-forage diets than in sheep fed diets including concentrates. The lack of differences between diets in bacterial diversity in the LIQ phase of the fermenters supports the results of Martínez et al. (2010c), who used ARISA to assess the bacterial diversity in the ruminal fluid of sheep and Rusitec fermenters fed four different diets and observed no effects of diet. In contrast, Kocherginskaya et al. (2001) reported higher diversity indices in the LIQ phase of the rumen of corn-fed steers than in hay-fed animals by using both DGGE and shotgun libraries. Diet has been repeatedly shown to affect the bacterial community profile, but it is difficult to draw general conclusions, as its influence on bacterial populations in SOL and LIQ digesta may be variable. In addition, the fingerprinting technique used to measure bacterial diversity could influence the results obtained (Saro et al., 2014b), which makes difficult a direct comparison of results from different studies.

The evolution of fermentation parameters confirm previous results indicating that an 8-day adaptation period was adequate to reach steady-state conditions in the fermenters, because most of parameters had similar values on days 8 and 14 (Martínez et al., 2011b). The decrease on propionate proportions observed from day 8 to 14 was *accompanied* by an increase in butyrate proportions, which was possibly due to changes in bacterial populations, as indicated by the clustering of samples according sampling day in the dendrograms of ARISA profiles of bacterial communities (Figures 4.4.2A and 4.4.2B). Differences between the two diets in fermentation parameters followed the pattern observed *in vivo* (Ramos et

al., 2009; Martínez et al., 2010a) and in Rusitec fermenters (Gómez et al., 2005; Martínez et al., 2010a) for diets with different concentrate proportions. The association between the increasing caproate proportions and samples from HC-fermenters taken on days 8 and 14 is consistent with the results of Martínez et al. (2011b), who observed that caproate proportions in Rusitec fermenters fed a HC-diet increased by 7.0-fold from day 1 to 14 of incubation. The PCA (Figure 4.4.3A) placed the 3-day SOL samples from MC-fermenters coupled with increasing abundance of the 3 cellulolytic bacteria, which is in agreement with the greater abundance of cellulolytic bacteria observed in sheep fed high- or medium-forage diets compared with those fed high-concentrate diets (Mosoni et al., 2007). The abundance of cellulolytic bacteria was related to butyrate proportions, but surprisingly was not associated to acetate proportions. As pointed out by Mossoni et al. (2007), qPCR quantifies both viable and non-viable cells and therefore may not reflect the real activity of these species in the rumen at the sampling time.

Belanche et al. (2011) compared estimates of microbial growth in lambs slaughtered at 45 and 90 days of age using purine bases as a microbial marker with those derived from rDNA sequences (bacterial and protozoal DNA) and, after observing that both methods detected similar differences between both groups, concluded that microbial rDNA sequences could be considered as potential internal markers to determine microbial synthesis *in vivo*. Our *in vitro* study comparing ^{15}N and rDNA sequences confirmed only partially their results, as both markers detected greater microbial growth in MC-fermenters than in HC-fermenters, but microbial growth was greater in SOL than in LIQ with ^{15}N whereas the opposite was detected by using microbial rDNA. It has to be taken into account that both ^{15}N enrichment and rDNA sequences were assessed in the same SOL samples, but in different LIQ samples: ^{15}N enrichment was determined in the effluent collected daily and rDNA sequences in a sample of the LIQ

fermenters' content taken before feeding. This was done to collect SOL and LIQ samples at the same time in relation to feeding. In addition, effluent was collected in flasks containing a solution of H₂SO₄ to stop fermentation and prevent microbial growth and the acidic conditions were expected to damage the microbial DNA, thus preventing the use of these samples for qPCR analysis. Studies analyzing ¹⁵N enrichment and rDNA sequences in the same LIQ samples (i.e. in the effluent collected in flasks maintained in an iced water batch) are needed to confirm the suitability of rDNA sequences as microbial markers to estimate microbial growth *in vitro*.

4.4.6 Conclusions

The Rusitec system was able to maintain all microbial populations studied, but the abundance of most of them decreased over the incubation period. This was attributed to the daily exposure of microbes to oxygen, as well as the daily removal of the solid digesta when the nylon bags are withdrawn from the fermenters to introduce new bags with feed. The microbial shifts differed from those reported in continuous-culture fermenters, which helps to explain the differences in fermentation parameters observed previously between the two types of fermenters when both were fed the same diets.

Distinct microbial populations were found in the solid and liquid phases of the fermenters, reflecting the high compartmentalization in the Rusitec system. The diet had also a marked influence on microbial populations, and the dietary differences agreed with those found in other studies. In general, the influence of the diet on microbial populations was more pronounced in the solid digesta than in the liquid phase, but relationships among microbial populations and fermentation parameters were in well agreement with those observed in previous *in vivo* studies. The fermentation parameters remained fairly stable over the commonly used sampling period (days 8 to 14), but marked shifts in microbial

populations were detected, which highlights the complex interactions among the rumen microbes. Studies with different sampling times after feeding are needed to better characterize the temporal evolution of microbes in Rusitec fermenters. The use of ^{15}N as a microbial marker or rDNA sequences for estimating microbial protein synthesis produced similar results for diet comparison, but both methods offered contrasting results for microbial growth in the solid and liquid phases of the digesta, which was attributed to the different origin of liquid samples (fermenters' content *vs.* effluent).

Author contributions

MDC and MJR designed the experiment. IM, CS, MDC and MJR conducted the Rusitec incubations. IM and CS performed the analyses of samples. MDC, IM, CS and MJR contributed to write the paper. All authors review and approved the submitted manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness under the Project AGL2011-22628. We would like to thank Dr. Benjamin Rabanal for helping us with qPCR and ARISA analyses.

4.4.7 References

- Belanche, A., de la Fuente, G., and Newbold, C.J. (2014). Study of methanogen communities associated with different rumen protozoal populations. *FEMS Microbiol Ecol.* 90, 663-687. doi: 10.1111/1574-6941.12423
- Belanche, A., de la Fuente, G., Yáñez-Ruiz, D.R., Newbold, C.J., Calleja, L., Balcells, J. (2011). Technical note: The persistence of microbial-specific DNA sequences through gastric digestion in lambs and their potential use as microbial markers. *J. Anim. Sci.* 89, 2812–2816. doi:10.2527/jas.2010-3193
- Carberry, C.A., Kenny, D.A., Han, S., McCabe, M.S., and Waters, S.M. (2012). Effect of Phenotypic Residual Feed Intake and Dietary Forage Content on the Rumen Microbial Community of Beef Cattle. *Appl. Environm. Microbiol.* 78, 4949–4958. doi:10.1128/AEM.07759-11

- Carro M.D., Lebzien P., and Rohr K. (1992). Influence of yeast culture on the *in vitro* fermentation (Rusitec) of diets containing variable portions of concentrates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 37, 209-220. doi: 10.1016/0377-8401(92)90005-Q
- Carro, M. D., M. J. Ranilla, I. Martín-García, and E. Molina-Alcaide. (2009). Comparison of microbial fermentation of high- and low-forage diets in sheep rumen and two types of fermenters. *Animal* 3-4, 527-534. doi: 10.1017/S1751731108003844
- 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 Rum. Res.* 15, 113-119. doi: 10.1016/0921-4488(94)00015-Y
- Castillejos L., Calsamiglia, S., Ferret, A., and Losa, R. (2007). Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132, 186–201. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.03.023
- Chen, X. L., Wang, J.K., Wu, Y.M., and Liu, J.X. (2008). Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid- and solid-associated ruminal microbes *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141, 1–14. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.04.006
- 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, 313-22. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00394.x
- Franzolin, R., and Dehority, B.A. (1996). Effect of Prolonged High-Concentrate Feeding on Ruminal Protozoa Concentrations. *J. Anim. Sci.* 74, 2803–2809.
- Fraser G.R., Chaves A.V., Wang Y., McAllister T.A., Beauchemin K. A., and Benchaar C. (2007). Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems. *J. Dairy Sci.* 90, 2315–2328. doi: 10.3168/jds.2006-688

- Giraldo, L.A., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., and Carro, M.D. (2007). Influence of exogenous fibrolytic enzyme and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters. *Br. J. Nutr.* 98, 753-761. doi: 10.1017/S0007114507744446
- Gómez J.A., Tejido, M.L., and Carro, M.D. (2005). Mixed rumen microorganisms growth and rumen fermentation of two diets in RUSITEC fermenters: influence of disodium malate supplementation. *Br. J. Nutr.* 93, 479-484. Doi: 10.1079/BJN20041367
- Hailan, P. Lachman, M., Malfatti, S., Sczyrba, A., Knierim, B., Auer, M., et al. (2004). Temporal dynamics of fibrolytic and methanogenic rumen microorganisms during in situ incubation of switchgrass determined by 16S rRNA gene profiling. *Front. Microbiol.* 5, doi:10.3389/fmicb.2014.00307
- Hoover, W. H., Crooker, B.A., and Sniffen, C.J. (1976). Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43, 528-534. doi:10.2134/jas1976.432528x
- Hristov, A.N., C. Lee, R. Hristova, P. Huhtanen, and J.L. Firkins. (2012). A meta-analysis of variability in continuous-culture ruminal fermentation and digestibility data. *J. Dairy Sci.* 95, 5299-5307. doi: 10.3168/jds.2012-5533
- Kocherginskaya, S.A., Aminov, R.I., and White, B.A. (2001). Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe* 7, 119-134. doi: 10.1006/anae.2001.0378
- Koike, S., and Y. Kobayashi. (2001). Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 361-366. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10911.x
- Kostyukovsky, V., Inamoto, Z.T., Anado, T., Nakai, Y., and Ogimoto, K. (1995). Short Communication. Degradation of hay by rumen fungi in artificial rumen (Rusitec). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41: 83-86. doi <http://doi.org/10.2323/jgam.41.83>
- Larue, R., Yu, Z., Parisi, V.A., Egan, A.R., and Morrison, M. (2005). Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. *Environ. Microbiol.* 7, 530-543. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00721.x

- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Ramos, S., Tejido, M.L., and Carro, M.D. (2011b). Evolution of fermentation parameters in Rusitec fermenters operated at different dilution rates and concentrate retention times. *Options Méditerranéennes, Serie A* 99, 121-126.
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Ramos, S., Tejido, M.L., and Carro, M.D. (2011a). Protozoa evolution in Rusitec fermenters fed diets differing in forage:concentrate ratio and forage type. *Options Méditerranéennes Serie A* 99, 97-102.
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Ramos, S., Tejido, M.L., and Carro, M.D. (2011b). Evolution of fermentation parameters in Rusitec fermenters operated at different dilution rates and concentrate retention times. *Options Méditerranéennes, Serie A* 99, 121-126.
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Ramos, S., and Carro M.D. (2010b). The effect of the diet fed to donor sheep on *in vitro* methane production and ruminal fermentation of diets of variable composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 158, 126–135. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2010.04.005
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Ramos, S., and Carro, M.D. (2010a). Comparison of fermentation of diets of variable composition in the rumen of sheep and Rusitec fermenters: I. Digestibility, fermentation parameters and efficiency of microbial protein synthesis. *J. Dairy Sci.* 93, 3684-3698. doi: 10.3168/jds.2009-2933
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Ramos, S., and Carro, M.D. (2010c). Comparison of fermentation of diets of variable composition in the rumen of sheep and Rusitec fermenters: II. Protozoa Populations and Diversity of Bacterial Communities. *J. Dairy Sci.* 93, 3699-3712. doi: 10.3168/jds.2009-2934
- Martínez-Fernandez, G., Abecia, L., Martín-García, A. I., Ramos-Morales, E., Denman, S. E., Newbold, C. J., et al. (2015). Response of the rumen archaeal and bacterial populations to anti-methanogenic organosulphur compounds in continuous-culture fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, fiv079. doi: 10.1093/femsec/fiv079
- McDougall, E. I. (1948). Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43, 99–109. doi: 10.1042/bj0430099
- Michalet-Doreau, B., Fernandez, I., Peyron, C., Millet, L., and Fonty, G. (2001). Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod. Nutr. Dev.* 41, 187–194. doi: 10.1051/rnd:2001122

- Mosoni, P., Chaucheyras-Durand, F., Béra-Maillet, C., and Forano, E. (2007). Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2676-2685. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03517.x
- Muetzel, S., Lawrence, P. Hoffmann, L.M., and Becker, K. (2009). Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 151, 32-43. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2008.11.001
- Nakamura F., and Kurihara Y. (1978). Maintenance of a certain rumen protozoal population in a continuous *in vitro* fermentation system. *Appl. Environm. Microbiol.* 35, 500-506.
- Prevot, S., Senaud, J., and Prensier, G. (1994). Variation in the composition of the ruminal bacterial microflora during the adaptation phase in an artificial fermenter (Rusitec). *Zoolog. Sci.* 11, 871-882.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., and Wagner, H. (2015). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.3-2. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Ramos, S., Tejido, M.L., Martínez, M.E., Ranilla, M.J., and Carro, M.D. (2009). Microbial protein synthesis, ruminal digestion, microbial populations, and N balance in sheep fed diets varying in forage to concentrate ratio and type of forage. *J. Anim. Sci.* 87, 2924-2934. doi: 10.2527/jas.2009-1938
- Ranilla, M.J., Carro, M.D., Valdés, C., Giráldez, F.J., and López, S. (1997). [A comparative study of ruminal activity in Churra and Merino sheep offered alfalfa hay](#). *Anim. Sci.* 65, 121-128. doi: 10.1017/S1357729800016374
- Ranilla, M.J., López, S., Giráldez, F.J., Valdés, C., and Carro, M.D., (1998). Comparative digestibility and digesta flow kinetics in two breeds of sheep. *Anim. Sci.* 66, 389-396. doi: 10.1017/S1357729800009528
- Saro, C., Ranilla, M.J., and Carro, M.D. (2012). Postprandial changes of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets varying in type of forage as monitored by real-time PCR and automated ribosomal intergenic spacer analysis. *J. Anim. Sci.* 90, 4487-4494. doi: 10.2527/jas.2012-5265
- Saro, C., Ranilla, M.J., Cifuentes, A., Roselló-Mora, R., and Carro, M.D. (2014b). Technical note: Comparison of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to assess bacterial diversity in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.* 92, 1083-1088. doi: 10.2527/jas.2013-7175

- Saro, C., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., and Carro, M.D. (2014a). Influence of forage type in the diet of sheep on rumen microbiota and fermentation characteristics. *Livest.Sci.* 160: 52–59. doi: 10.1016/j.livsci.2013.12.005
- Soto, E.C., Molina-Alcaide, E., Khelil, H., and Yáñez-Ruiz, D.R. (2013). Ruminal microbiota developing in different *in vitro* simulation systems inoculated with goats' rumen liquor. *Anim. Feed Sci. Technol.* 185, 9–18. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2013.06.003
- Soto, E.C., Yáñez-Ruiz, D.R., Cantalapiedra-Hijar, G., Vivas, A., and Molina-Alcaide, E. (2012). Changes in ruminal microbiota due to rumen content processing and incubation in single-flow continuous-culture fermenters. *Anim. Prod. Sci.* 52, 813-822. doi: 10.1071/AN11312
- Sylvester, J.T., Karnati, S. K. R., Yu, Z., 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.
- Thauer, R.K., Kaster, A.K., Seedorf, H., Buckel, W., and Hedderich, R. (2008). Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 579–591. doi:10.1038/nrmicro1931
- Tholen, A., M. Pester, and A. Brune. 2007. Simultaneous methanogenesis and oxygen reduction by *Methanobrevibacter cuticularis* at low oxygen fluxes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62:303–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17961173>
- van Kessel, J. A.S., and Russell, J.B. (1996). The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20, 205-210. doi: 10.1111/j.1574-6941.1996.tb00319.x
- Yu, Z., and Morrison, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques* 36, 808-812.
- Ziemer, C.J., Sharp, R., Stern, M.D., Cotta, M.A., Whitehead, T.R., and Stahl, D.A. (2000). Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S ribosomal RNA-targeted probes. *Environm. Microbiol.* 2, 632-643. doi: 10.1046/j.1462-2920.2000.00146.x

Table 4.4.1 Evolution through the incubation period of total bacterial DNA, total protozoal DNA, and the relative abundance of *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes*, methanogenic archaea and fungal DNA in solid and liquid contents of Rusitec fermenters fed diets with medium (MC) and high (HC) concentrate content (n = 4)

Sample	Item	Diet	Incubation day			SEM	P-value		
			3	8	14		Diet	Time	Diet x time
Solid content	Total bacteria, µg DNA / g DM	MC	176	222	330	30.3	0.002	0.224	0.009
		HC	192	129	124				
	Total protozoa, µg DNA / g DM	MC	348 ^b	47.5 ^a	35.0 ^a	26.701	<0.001	<0.001	<0.001
		HC	52.6	6.87	0.82				
	Relative abundance of ¹ :								
	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	MC	33.4 ^c	13.3 ^b	4.56 ^a	2.437	0.021	<0.001	0.003
		HC	16.4 ^b	13.4 ^{ab}	6.06 ^a				
	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	MC	6.29	6.82	7.86	1.006	<0.001	0.722	0.175
		HC	2.38	0.20	0.05				
	<i>Ruminococcus albus</i>	MC	13.5	11.7	14.6	1.619	<0.001	0.012	0.007
		HC	13.1 ^b	5.51 ^{ab}	1.78 ^a				
	Methanogenic archaea	MC	0.204 ^a	0.403 ^a	0.674 ^b	0.0831	0.002	0.021	0.074
		HC	0.122	0.197	0.185				
	Fungi	MC	6.82	8.56	4.01	4.250	0.003	0.024	0.117
HC		27.2 ^b	23.2 ^b	5.78 ^a					
Liquid content	Total bacteria, µg DNA / ml	MC	16.52 ^a	21.25 ^b	25.50 ^c	0.971	0.998	<0.001	0.073
		HC	15.60 ^a	19.39 ^b	28.27 ^c				
	Total protozoa, µg DNA / ml	MC	82.9 ^b	27.4 ^a	14.6 ^a	5.943	<0.001	<0.001	<0.001
		HC	8.89	3.07	0.77				
	Relative abundance of ¹ :								
	Methanogenic archaea	MC	0.398	0.290	0.311	0.0393	<0.001	0.089	0.334
		HC	0.232	0.222	0.132				
	Fungi	MC	0.277	0.131	0.076	0.0836	0.086	0.002	0.142
		HC	0.583 ^b	0.254 ^a	0.275 ^a				

^{a, b, c} Within each row, means without a common superscripts differ ($P < 0.05$). Superscripts are only shown when a significant ($P < 0.05$) P value for time effect was detected.

¹ Microbes DNA measured relative to total bacterial DNA, calculated as $2^{- (Ct \text{ target} - Ct \text{ total bacteria})} \times 10^2$.

Table 4.4.2 Evolution through the incubation period of Shannon index and numbers of peaks detected in the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) electropherograms in solid and liquid contents of Rusitec fermenters fed diets with medium (MC) and high (HC) concentrate content, and similarity index of ARISA profiles between solid and liquid contents

Sample	Item	Diet	Incubation day			SEM	P-value		
			3	8	14		Diet	Time	Diet x time
Solid content	Shannon index	MC	3.30 ^a	3.56 ^b	3.59 ^b	0.076	<0.001	<0.001	0.233
		HC	2.88 ^a	3.42 ^b	3.27 ^b				
	Numbers of peaks	MC	27.3 ^a	35.3 ^b	36.3 ^b	2.13	<0.001	<0.001	0.368
		HC	18.5 ^a	31.5 ^b	26.8 ^b				
Liquid content	Shannon index	MC	3.40	3.69	3.57	0.063	0.764	0.118	0.069
		HC	3.56	3.54	3.51				
	Numbers of peaks	MC	30.0	40.3	36.0	2.17	0.678	0.115	0.071
		HC	35.3	34.8	34.0				
Solid-Liquid	Similarity index, %	MC	60.8 ^a	70.2 ^b	68.3 ^{ab}	2.61	0.952	0.009	0.490
		HC	62.5 ^a	71.9 ^b	64.5 ^{ab}				

^{a, b, c} Within each row, means without a common superscripts differ ($P < 0.05$). Superscripts are only shown when a significant ($P < 0.05$) P value for time effect was detected.

Table 4.4.3 Evolution through the incubation period of fermentation parameters and enzymatic activity in Rusitec fermenters fed diets with medium (MC) and high (HC) concentrate content (n = 4)

Item	Diet	Incubation day			SEM	P-value		
		3	8	14		Diet	Time	Diet x time
pH	MC	6.48	6.41	6.43	0.064	<0.001	0.780	0.816
	HC	5.89	5.87	5.91				
Total VFA (mmol/d)	MC	112	118	115	2.84	<0.001	0.345	0.689
	HC	95.3	97.3	98.4				
Molar proportions (mol/100 mol):								
Acetate	MC	56.5 ^b	54.9 ^{ab}	54.0 ^a	0.60	0.1258	<0.001	<0.001
	HC	50.7 ^a	56.8 ^b	55.5 ^b				
Propionate	MC	21.4 ^c	16.5 ^b	15.2 ^a	0.32	<0.001	<0.001	0.002
	HC	26.5 ^c	19.8 ^b	17.3 ^a				
Butyrate	MC	15.6 ^a	16.3 ^{ab}	17.3 ^b	0.52	0.2058	0.003	0.003
	HC	17.2 ^b	13.5 ^a	16.8 ^b				
Isobutyrate	MC	1.15	1.28	1.33	0.163	<0.001	0.469	0.980
	HC	0.32	0.43	0.55				
Isovalerate	MC	1.76 ^a	2.94 ^b	4.29 ^c	0.325	<0.001	<0.001	0.267
	HC	0.97 ^a	1.63 ^{ab}	2.39 ^b				
Valerate	MC	2.50 ^a	5.00 ^b	4.96 ^b	0.255	<0.001	<0.001	0.015
	HC	2.19 ^a	3.29 ^b	3.09 ^b				
Caproate	MC	1.10 ^a	3.06 ^b	2.95 ^b	0.198	<0.001	<0.001	0.370
	HC	2.07 ^a	4.58 ^b	4.31 ^b				
Acetate:Propionate (mol/mol)	MC	2.65 ^a	3.31 ^b	3.57 ^c	0.086	<0.001	<0.001	0.090
	HC	1.91 ^a	2.87 ^b	3.23 ^c				
CH ₄ (mmol/d)	MC	23.3	24.2	24.2	0.89	<0.001	0.985	0.623
	HC	16.3	15.6	15.8				

Table 4.4.3 Continued

Item	Diet ¹	Incubation day			SEM	P-value		
		3	8	14		Diet	Time	Diet x time
Lactate (g/l)	MC	10.6 ^b	4.6 ^a	4.7 ^a	0.96	0.015	<0.001	0.481
	HC	13.9 ^b	5.5 ^a	6.8 ^a				
NH ₃ (mg/l)	MC	346	339	348	8.70	<0.001	0.053	0.063
	HC	105	71.5	61.5				
Enzymatic activity ¹								
Amylase	MC	314	282	265	67.5	<0.001	0.026	0.098
	HC	856 ^b	603 ^a	501 ^a				
Xylanase	MC	681 ^b	711 ^b	512 ^a	26.0	0.770	<0.001	0.012
	HC	778 ^c	660 ^b	444 ^a				

^{a, b, c} Within each row, means without a common superscripts differ ($P < 0.05$). Superscripts are only shown when a significant ($P < 0.05$) P value for time effect was detected.

¹ Amylase activity is expressed as nanomoles of glucose released from soluble starch by 1 ml of liquid fermenters' content in 1 min at 39°C and pH 6.5. Xylanase activity is expressed as nanomoles of xylose liberated from oat spelt xylan by 1 ml of liquid fermenters' content in 1 min at 39°C and pH 6.5.

Table 4.4.4 Daily microbial growth in the solid and liquid phases of Rusitec fermenters fed diets with medium (MC) and high (HC) concentrate content as determined using ¹⁵N as a microbial marker or from bacterial and protozoal DNA concentrations

Item	Digesta phase	Diet	Microbial growth	SEM	P-value		
					Diet	Digesta phase	Diet x digesta phase
¹⁵ N (mg microbial N/d)	Solid	MC	127.8	4.59	<0.001	0.004	0.949
	Liquid		109.5				
	Solid	HC	88.8				
	Liquid		69.8				
Bacterial plus protozoal DNA (mg DNA/d)	Solid	MC	4.44	1.230	0.013	<0.001	0.146
	Liquid		11.8				
	Solid	HC	1.55				
	Liquid		12.9				
Bacterial DNA (mg DNA/d)	Solid	MC	4.01	1.071	0.509	<0.001	0.416
	Liquid		11.5				
	Solid	HC	1.54				
	Liquid		12.51				

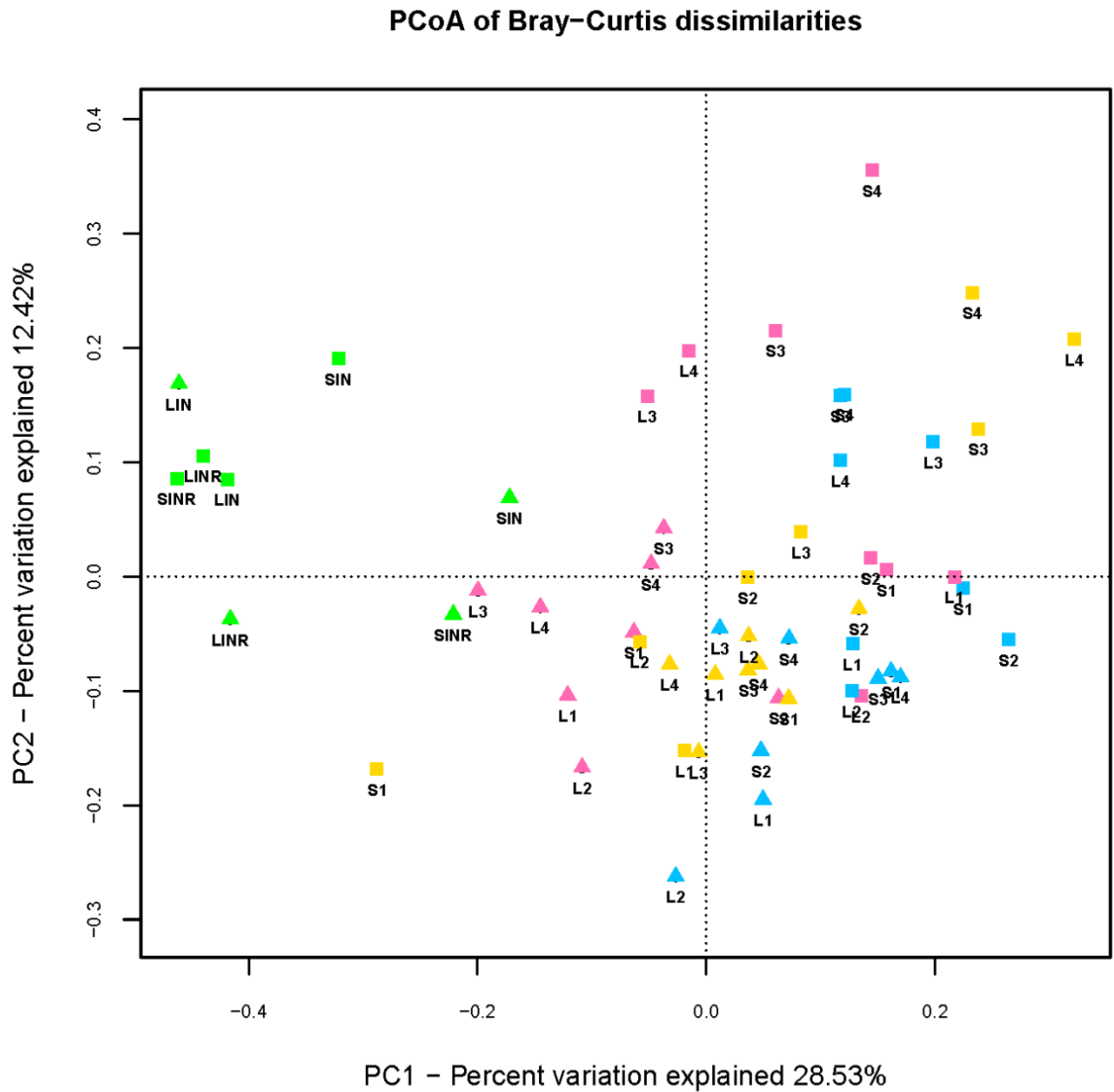


Figure 4.4.1 Principle coordinates analysis plot of Bray–Curtis dissimilarities in the ARISA profiles of DNA samples from liquid (L) and solid (S) phases from Rusitec fermenters fed medium-concentrate (triangles) or high-concentrate (squares) diets. Points are colored according sampling time on day 0 (inocula, green), 3 (pink), 8 (yellow) and 14 (blue) after inoculation. Numbers 1-4 correspond to individual fermenters. Samples IN and INR are ruminal inocula in the incubation run 1 and 2, respectively.

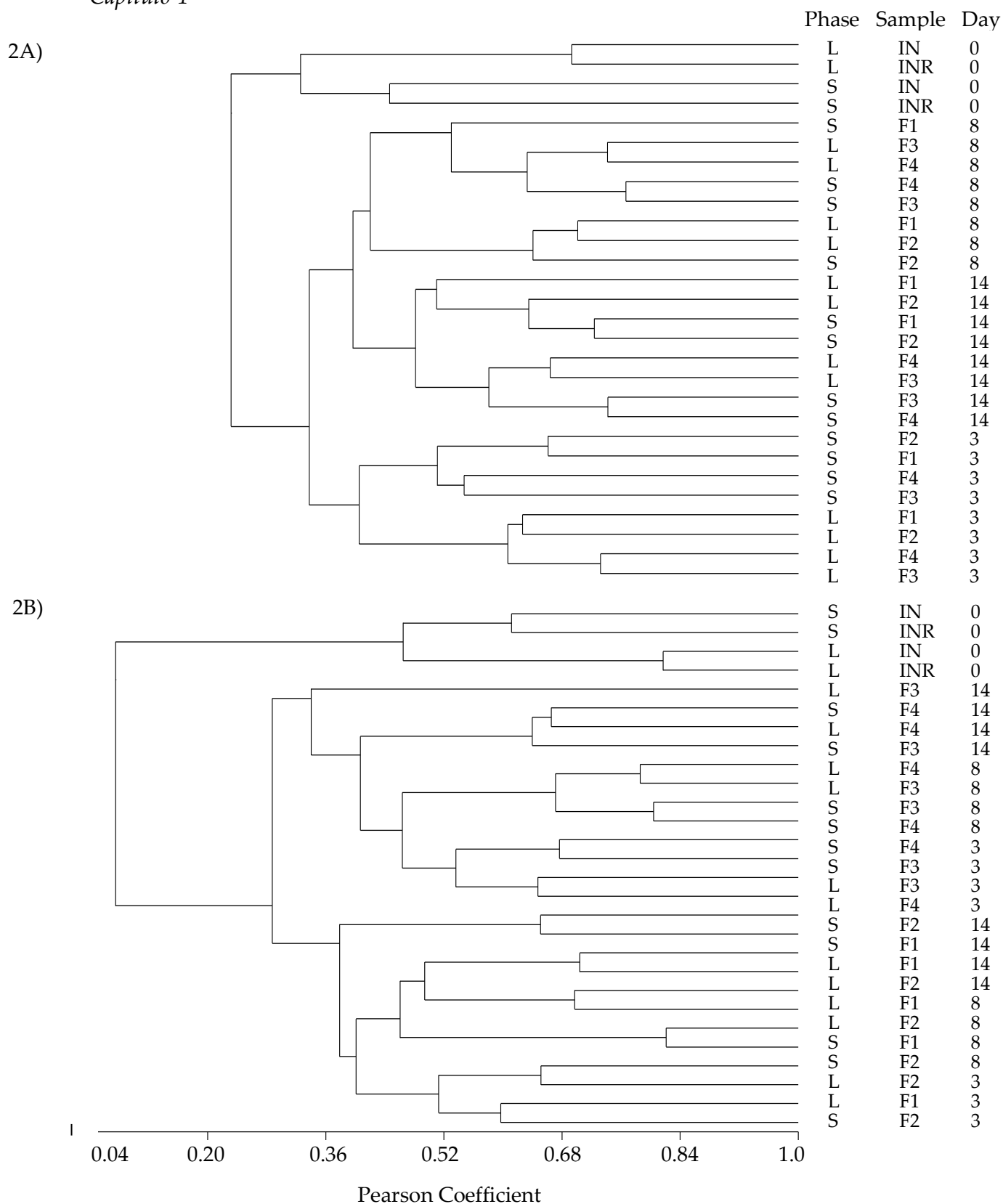


Figure 4.4.2 Dendrograms of ARISA profiles of bacterial communities in solid (S) and liquid (L) ruminal content from sheep used as inoculum (IN and INR) and in Rusitec fermenters (F) for medium- (2A) and high-concentrate diets (2B). Numbers 1 to 4 correspond to individual fermenters. In each case, donor sheep were fed the same diet incubated in the fermenters.

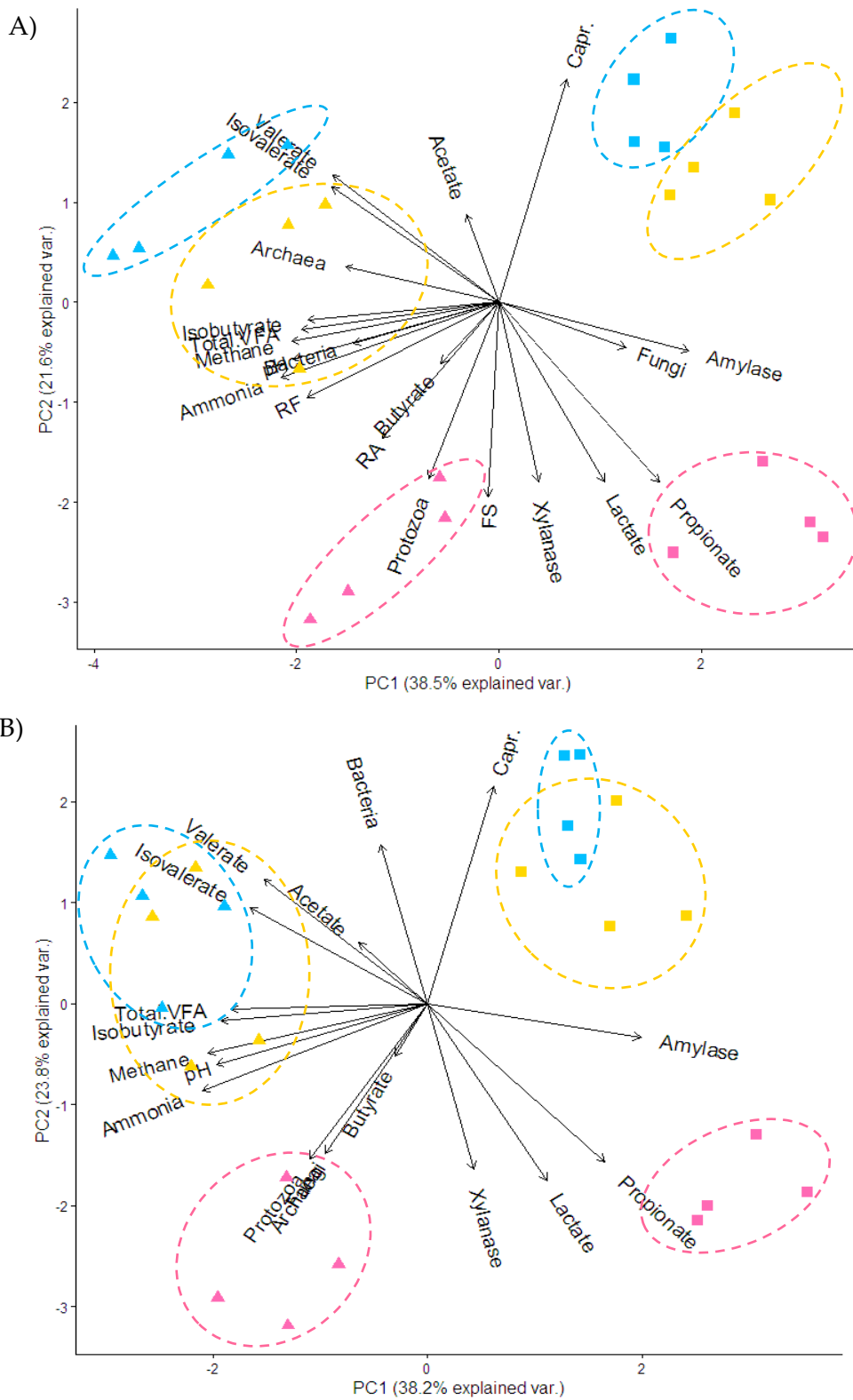


Figure 4.4.3 Principal component analysis plot of microbial populations and fermentation parameters, with arrows indicating increasing values. Samples from solid (Figure A) and liquid (Figure B) phases from Rusitec fermenters fed medium-concentrate (triangles) or high-concentrate (squares) diets. Points are colored according sampling time on day 3 (pink), 8 (yellow) and 14 (blue) after inoculation. Each symbol corresponds to a fermenter sample. Capr.: caproate; FS: *Fibrobacter succinogenes*; RF: *Ruminococcus flavefaciens*; RA: *Ruminococcus albus*.

Capítulo 5. Discusión general

El interés por la fermentación ruminal y la creciente preocupación por el uso de animales de experimentación en investigación han llevado al desarrollo de diversas técnicas *in vitro* que tratan de emular la fermentación ruminal. Además, la complejidad de la fermentación ha conducido a un constante estudio y perfeccionamiento de estas técnicas para poder replicar de manera precisa los procesos que acontecen en el rumen del animal. Estas técnicas cuentan con una variada posibilidad de usos: permiten estimar el valor nutritivo de los alimentos utilizados para animales rumiantes, analizar el efecto de diferentes aditivos sobre la fermentación ruminal o estimar el potencial metanogénico del contenido ruminal (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2016). Existen gran cantidad de estudios en los que se utilizan cultivos no renovados de microorganismos ruminales (CNRMR) para simular la fermentación ruminal *in vitro*, además de los que utilizan sistemas de fermentación continua que permiten mantener la fermentación durante varios días o semanas. Por ello en esta Tesis Doctoral se han realizado tres trabajos con CNRMR y uno con fermentadores RUSITEC. En el primero de los trabajos se evaluó la influencia de la dieta de los animales donantes y de la dieta incubada en los efectos detectados de diferentes dosis de dos extractos naturales de plantas (aceite de ajo y cinamaldehído) sobre la fermentación ruminal. En el segundo, se determinaron las características de la fermentación ruminal de diferentes dietas administradas a ovejas y utilizadas como sustratos en CNRMR, para investigar si las diferencias encontradas entre dietas *in vivo* se corresponden con lo observado *in vitro*. En el tercer trabajo se analizó la posible influencia del tipo de procesado del contenido ruminal utilizado como inóculo para los CNRMR sobre los microorganismos presentes en el inóculo, ya que la actividad de dicho inóculo es un factor importante que influye en la fermentación del sustrato, y su posterior efecto en los parámetros de la fermentación ruminal. Finalmente, en el experimento con fermentadores RUSITEC se ha estudiado la evolución de las poblaciones microbianas a lo largo del periodo de incubación, puesto que es un tema del que existe muy poca información en la bibliografía hasta la fecha.

El primer estudio fue diseñado específicamente para evaluar la influencia del tipo de dieta administrada a los animales donantes de líquido ruminal, e incubada en CNRMR, sobre los efectos de dosis crecientes de aceite de ajo (AA) y cinamaldehído (CIN) en la fermentación ruminal *in vitro*. Este trabajo fue realizado incubando dos dietas diferentes, representativas de la alimentación de ovinos, una compuesta por 50% de heno de alfalfa y 50% de concentrado (MC; utilizada para ganado ovino lechero) y la otra compuesta por 15% de paja de cebada y 85% de concentrado (AC; utilizada en corderos de cebo). En la mayoría de los estudios *in vitro* se evalúa el efecto de diferentes aditivos incubando un solo sustrato, pero algunos estudios demuestran una interacción del aditivo con el sustrato (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2016).

La adición de AA no disminuyó la producción total de AGV con ninguna dieta, sugiriendo que la fermentación ruminal no se inhibió ni siquiera a la dosis más alta (540 mg/L). De forma similar a nuestros resultados, Busquet *et al.* (2006) observaron que el AA a 300 mg/L no afectó la producción total de AGV en CNRMR con una dieta 50:50 forraje:concentrado como sustrato, aunque diez veces más altas disminuyeron ($P < 0,05$) la producción de AGV al 86% de la observada en el control. Los AGV representan la principal fuente de energía metabolizable para los rumiantes, y por lo tanto una reducción en su producción sería nutricionalmente desfavorable para el animal (Busquet *et al.* 2006) y debe evitarse. Las interacciones AA \times tipo de dieta observadas en algunos de los parámetros determinados podrían ser debido a las diferentes comunidades microbianas presentes en los dos inóculos. En general, los efectos del AA fueron más pronunciados para la dieta MC en comparación con la dieta AC, lo que indicaría que los efectos del AA varían con la dieta.

De acuerdo con nuestros resultados, otros estudios *in vitro* utilizando CNRMR y una dieta 50:50 forraje:concentrado (Busquet *et al.*, 2005a., 2006) o fermentadores de flujo continuo alimentados con una dieta 30:70

forraje:concentrado (Busquet *et al.*, 2005b) demostraron que la adición de AA a 300 mg/L aumentó la proporción de propionato y butirato y disminuyó la proporción de acetato. Por el contrario, Klevenhusen *et al.* (2011b) no observaron ningún efecto del AA sobre el perfil de AGV en el líquido ruminal de ovejas alimentadas con una dieta 50:50 forraje:concentrado y con una adición diaria de 5 g de AA durante 19 días. Las concentraciones de AA en el estudio de Klevenhusen *et al.* (2011b), estimadas suponiendo un volumen ruminal promedio de 7 L para una oveja (Ranilla *et al.*, 1998), eran aproximadamente 736 mg/L, e incluso a esta concentración el AA no afectó la concentración de AGV totales en el rumen o a la digestibilidad de la dieta. Debe tenerse en cuenta que en ovejas la salida de la digesta desde el rumen contribuiría a disminuir la concentración ruminal del AA con el tiempo, mientras que esta salida de digesta no ocurre en los CNRMR. En nuestro estudio, la cantidad de materia orgánica aparentemente fermentable (MOAF) no se vió afectada por ninguna de las dosis de AA en las dietas incubadas. La falta de efectos del AA en la producción total de AGV y en MOAF indicaría que el AA no modificó la fermentabilidad de las dietas, lo cual coincide con los resultados citados anteriormente.

Estudios previos han obtenido efectos significativos sobre la producción de metano del AA o de sus compuestos (disulfuro de dialilo y alicina) suministrados a niveles de 300 mg/L en CNRMR (Busquet *et al.*, 2005b) y en fermentadores RUSITEC (Soliva *et al.*, 2011) o a 76 mg/L en CNRMR (Macheboeuf *et al.*, 2006). Extractos de bulbos de ajo o incluso bulbos de ajo mezclados con la dieta han demostrado reducir la producción de metano en CNRMR (Patra *et al.*, 2010 y Staerfl *et al.*, 2010, respectivamente). En cambio, Kamel *et al.* (2008) con dosis bajas de alicina y dialil disulfuro (hasta 10 mg/L) o Kongmun *et al.* (2010) con polvo de ajo 320 mg/L no observaron efectos sobre la producción de metano. Sólo unos pocos ensayos *in vivo* han investigado los efectos del AA o sus compuestos en la producción de metano, pero sus resultados son contradictorios. Klevenhusen *et*

al. (2011a) observaron una disminución en la producción de metano en ovejas a las que se suministraba disulfuro de dialilo, pero en otro trabajo no detectaron efectos del disulfuro de dialilo o del AA (Klevenhusen *et al.*, 2011b). En otros estudios, no se encontró ningún efecto sobre la producción de metano al administrar disulfuro de dialilo a vacas lactantes (van Zijderveld *et al.*, 2011) o bulbos de ajo a ovejas (Patra *et al.*, 2011) y novillos en cebo (Staerfl *et al.*, 2012). Kongmun *et al.* (2011) observaron que añadir a la dieta de búfalos aceite de coco y polvo de ajo redujo la producción de metano, pero observaron una reducción similar sólo con aceite de coco. Cabe mencionar de nuevo que en nuestro estudio ninguna dosis de AA afectó negativamente a la producción de AGV y por lo tanto la proporción de metano:AGV disminuyó con las dosis de AA de 60, 180 y 540 mg/L, lo que indicaría un mayor suministro de energía para el animal.

En lo que se refiere al CIN, las dosis de 20, 60 y 180 mg/L de CIN solo provocaron sutiles efectos sobre la fermentación ruminal *in vitro*. En comparación con el control, CIN180 aumentó significativamente la proporción de acetato para las dietas MC y AC, respectivamente, sin afectar las proporciones o la producción total de AGV. Esto se reflejó en un aumento significativo en la relación acetato:propionato en las botellas que recibieron la dosis CIN180 para la dieta MC, pero no se detectaron cambios para la dieta AC. Los cambios menores en las proporciones de AGV producidos por la adición del CIN hasta 180 mg/L no produjeron diferencias en la cantidad de MOAF para ningún tipo de dieta, indicando que no hubo un claro efecto sobre la fermentabilidad de la dieta. Del mismo modo, Macheboeuf *et al.* (2008) observaron que la adición de CIN a dosis de 132 o 264 mg/L en CNRMR con una dieta AC no alteraba la producción total de AGV.

La administración de CIN a 540 mg/L (CIN540) redujo significativamente la producción total de AGV a un 90 y 58% respecto al control para las dietas MC y AC, respectivamente. Además, CIN540 redujo la proporción de acetato para la

dieta MC, pero aumentó la proporción de acetato y redujo la de propionato para la dieta AC, indicando un efecto diferente del CIN en el perfil de AGV de las dos dietas. Este efecto fue confirmado por la diferente respuesta observada a CIN540 en la relación acetato:propionato, que disminuyó significativamente para la dieta MC, pero aumentó para la dieta AC. Estos resultados indicarían una inhibición de la actividad fermentativa cuando el CIN fue adicionado a 540 mg/L, siendo este efecto más pronunciado para la dieta AC que para la dieta MC. Esta hipótesis es apoyada además por la menor cantidad de gas producida (97 y 88% de los valores control para las dietas MC y AC, respectivamente) y menor producción de metano (69 y 24% de los valores control para las dietas MC y AC, respectivamente). Por otra parte, las concentraciones de lactato en las botellas con CIN540 fueron 23 y 10 veces más altas comparadas con el control para las dietas MC y AC, respectivamente, lo que pudo ser debido a una inhibición de los microorganismos utilizadores de lactato. De acuerdo con nuestros resultados, Macheboeuf *et al.* (2008) observaron que el CIN suministrado en dosis de 396 mg/L en CNRMR con una dieta 75:25 forraje:concentrado redujo la producción de metano en un 19% y la producción de AGV en un 13%. En el estudio de Macheboeuf *et al.* (2008), el CIN en dosis de 661 mg/L inhibió casi totalmente la producción de metano (aproximadamente un 94%) y redujo drásticamente la producción de AGV totales (aproximadamente un 60%). Estos cambios indican que, en dosis altas, la actividad antimicrobiana de CIN es suficiente para inhibir casi totalmente la fermentación microbiana ruminal.

En nuestro estudio, el CIN60 y el CIN180 disminuyeron significativamente las concentraciones de NH₃-N en comparación con el control con la dieta MC, pero con la dieta AC se observó sólo una tendencia de CIN180 en este sentido. Los efectos del CIN sobre las concentraciones de NH₃-N ruminal encontrados en la literatura son contradictorios y parecen ser dependientes de la dosis y la dieta. Busquet *et al.* observaron que la adición de CIN reducía las concentraciones de

NH₃-N en fermentadores de doble flujo (Busquet *et al.* 2005a) y en CNRMR (Busquet *et al.* 2006), al igual que Cardozo *et al.* (2005) en trabajos realizados con CNRMR. Por el contrario, Benchaar *et al.* (2007) no observaron efectos en las concentraciones de NH₃-N al añadir CIN a CNRMR. En nuestro estudio, CIN60 y CIN180 redujeron las concentraciones de NH₃-N tanto para la dieta MC como para la dieta AC, lo que concuerda bien con los resultados de Busquet *et al.* (2005a, 2006). Por el contrario, Chaves *et al.* (2008) no encontraron efectos del CIN en las concentraciones de NH₃-N ruminal en corderos a los que se les administraba diariamente CIN. Yang *et al.* (2010) tampoco encontraron ningún efecto sobre las concentraciones de NH₃-N ruminal en bueyes a los cuales se les administraba diariamente diferentes concentraciones de CIN. Ambos estudios (Chaves *et al.* (2008) y Yang *et al.* (2010)) se llevaron a cabo en rumiantes alimentados con una dieta baja en forraje, y la ausencia de efectos del CIN coincide con nuestros resultados para el CIN20 y el CIN60 con la dieta AC, sugiriendo que se necesitan dosis mayores de CIN para modificar la fermentación ruminal *in vivo*. Sin embargo, en el estudio de Yang *et al.* (2010) la dosis más alta disminuyó la ingesta de nutrientes, la digestibilidad ruminal, especialmente de la FND, y la digestibilidad del N ingerido, lo que pone de relieve la importancia de investigar los posibles efectos secundarios antinutricionales de los aditivos en la alimentación animal.

Las diferencias entre los dos tipos de dieta en los principales parámetros de fermentación siguieron el patrón observado en el líquido ruminal de ovejas alimentadas con las mismas dietas. Nuestros resultados coinciden con estudios previos (Gomez *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2010b) mostrando que la producción de metano *in vitro* se ve afectada por la relación forraje:concentrado en la dieta de las ovejas donantes y en el sustrato incubado. La producción de metano fue aproximadamente 1,2 veces mayor con la dieta MC en comparación con la dieta AC (valor promedio de los tratamientos experimentales). Aunque los estudios *in*

vitro tienen algunas limitaciones, constituyen una herramienta útil para evaluar un gran número de tratamientos experimentales antes de realizar ensayos *in vivo*.

En resumen, los efectos del AA y del CIN sobre la fermentación *in vitro* de dos tipos de dieta (leche *versus* cebo) fueron dependientes de la dosis y la dieta. Por tanto, la efectividad de ambos para manipular la fermentación ruminal dependerá de las características de la dieta suministrada a los animales, lo que pone de relieve la importancia de probar los aditivos con diferentes tipos de dieta. Estos resultados tendrían importantes consecuencias prácticas si se confirman *in vivo*, aunque debe tenerse en cuenta que algunas dosis altas utilizadas en el presente estudio serían imposibles de suministrar en la alimentación práctica de rumiantes debido a la gran cantidad de aditivo que se necesitaría y a sus posibles efectos negativos en la ingestión o en las características de los productos animales.

Puesto que la dieta incubada tiene una importante relevancia sobre la fermentación ruminal y por tanto sobre el efecto de los aditivos utilizados para su modificación (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2016), en el segundo trabajo de esta Tesis se propuso evaluar la capacidad de CNRMR para reproducir la fermentación ruminal *in vivo* de dietas de composición variable y analizar los cambios producidos en las comunidades bacterianas durante el período de incubación determinados. Para ello, se utilizaron cuatro ovejas canuladas en el rumen que se alimentaron con 4 dietas diferentes, resultado de la combinación dos proporciones de forraje y concentrado (70:30 y 30:70) y dos forrajes diferentes (heno de alfalfa y heno de gramíneas). El fluido ruminal de estas ovejas fue utilizado para la incubación en CNRMR de las mismas 4 dietas y los principales parámetros de fermentación fueron determinados a las 24 h de incubación.

La falta de marcadas diferencias en el pH entre dietas de alto contenido en forraje (AF) y dietas de alto contenido en concentrado (AC) observadas en los

CNRMR fue en parte debida a la alta capacidad amortiguadora de la solución tampón que impidió una bajada del pH en las botellas con las dietas AC. Por lo tanto, la disminución del pH observada en las ovejas alimentadas AC no pudo reproducirse en los CNRMR, y esto se reflejó también en los mayores valores de pH *in vitro* en comparación con los observados en las ovejas para todas las dietas. Las concentraciones de $\text{NH}_3\text{-N}$ en los CNRMR fueron más altas que las observadas *in vivo* y mayores que los valores observados generalmente en el rumen de animales alimentados con dietas similares (Mackie *et al.*, 1978; Carro *et al.*, 2000). Esto fue debido, posiblemente, a la utilización en el sistema *in vitro* de una solución buffer y minerales enriquecida con N y a la falta de absorción en los CNRMR. En este sentido, la solución tampón-mineral de Goering y Van Soest (1970) modificada utilizada en este estudio suministró 84,11 mg de N por L en forma NH_4HCO_3 , que pudo ser degradado rápidamente a NH_3 por los microorganismos ruminales. Estos resultados indicarían que, reduciendo la cantidad de N en la solución tampón y minerales (por ejemplo, NH_4HCO_3 sustituido por NaHCO_3) se ayudaría a lograr concentraciones de $\text{NH}_3\text{-N}$ más fisiológicas en los CNRMR cuando se incuban dietas similares a las utilizadas en la práctica en la alimentación de los rumiantes. Por el contrario, las concentraciones de lactato fueron menores en los CNRMR que *in vivo*, lo cual confirma estudios anteriores (Tejido *et al.*, 2005; Mateos *et al.*, 2013). Estos resultados pueden sugerir una menor producción de lactato o una mayor utilización de lactato en los CNRMR en el rumen de las ovejas, pero probablemente la alta capacidad amortiguadora de la solución tampón evitó valores de pH bajos que pudieran haber estimulado el crecimiento de los microorganismos productores de lactato.

La cantidad de alimento y el flujo de digesta ruminal son diferentes en los sistemas *in vitro* e *in vivo*, y esto puede explicar algunas de las diferencias observadas en la magnitud de los parámetros medidos. Las menores

concentraciones de AGV totales en los CNRMR comparadas con el rumen de las ovejas coinciden con observaciones previas (Brown *et al.*, 2002; Rymer y Givens, 2002) y pueden atribuirse a la menor proporción alimento/fluido ruminal en CNRMR (0,01; 0,4 g MS en 40 mL) que *in vivo* (0,17; 1,184 g MS en un volumen de rumen estimado de 7000 mL; Ranilla *et al.*, 1998). Sin embargo, debe considerarse también que los AGV son extraídos del rumen por absorción y por el flujo hacia las siguientes secciones del aparato digestivo, mientras que en los CNRMR no existe ningún flujo de digesta o absorción. A pesar de las diferencias de magnitud en la concentración total de AGV, se observaron correlaciones significativas entre ambas mediciones para las principales proporciones de AGV. Estos resultados concuerdan con los de Rymer y Givens (2002), quienes también encontraron correlaciones significativas entre el perfil de AGV en CNRMR y en el rumen de ovejas alimentadas con 3 dietas mixtas. Por el contrario, Brown *et al.* (2002) no observaron ninguna correlación entre los AGV medidos en CNRMR y en el rumen de novillos alimentados con 8 forrajes diferentes. Estos autores atribuyeron la falta de relación a la utilización de una especie animal diferente (ovejas) como fuente de líquido ruminal para el experimento con CNRMR. Además, el experimento *in vivo* se realizó con novillos alimentados únicamente con forraje, mientras que las ovejas donantes de líquido ruminal para el experimento *in vitro* fueron alimentadas con una dieta mixta (600 g forraje/kg y 400 g concentrado/kg).

La correlación observada en nuestro estudio entre el perfil de AGV *in vivo* e *in vitro* indicaría un patrón similar de fermentación en ambos sistemas, aunque las proporciones de acetato fueron menores y mayores las de propionato en los CNRMR que en las ovejas. Como señalaron Rymer y Givens (2002), algunas diferencias entre las fermentaciones *in vitro* e *in vivo* pueden explicarse en parte por las bacterias fibrolíticas, que pueden ser más activas *in vivo* que *in vitro*. La inevitable manipulación del contenido del rumen para su uso como inóculo

implica una cierta exposición al oxígeno que reduce la viabilidad de estas bacterias (Russell y Wilson, 1996). Esto ayudaría a explicar las menores proporciones de acetato en los CNRMR, lo cual coincide con una digestibilidad de la FND más baja *in vitro*, debido a que el acetato se produce principalmente en la fermentación de carbohidratos estructurales. Las concentraciones más altas de isovalerato y valerato en los CNRMR que en las ovejas también pueden indicar una menor captura de estos AGV de cadena ramificada por las bacterias fibrolíticas, ya que utilizan estos AGV para la síntesis de aminoácidos esenciales, ácidos grasos de cadena larga y aldehídos (Bryant, 1973).

Los cambios en las comunidades bacterianas se estudiaron mediante el análisis automático del espacio intergénico ribosomal (ARISA). El índice de similitud entre las comunidades bacterianas del inóculo y de los CNRMR correspondientes osciló entre el 67,2 y 74,7% para las diferentes dietas. Estos valores son similares al 70,2% de similitud encontrado por Prates *et al.* (2010) al comparar la estructura de las comunidades bacterianas en cultivos de flujo semicontinuo con heno de alfalfa como sustrato después de 24 h de incubación con la del líquido ruminal utilizado como inóculo. Estos resultados indican que se produjeron algunos cambios en las comunidades bacterianas durante el período de incubación. Las diferentes condiciones en los CNRMR, como la elevada capacidad tampón del medio de incubación, la concentración de sustrato en las botellas (sustrato/medio de cultivo), el tiempo de retención de digesta, la falta de contracciones, etc., en comparación con el rumen de ovejas podrían haber influido en la selección de algunas cepas bacterianas en el sistema *in vitro*. Dada la amplia gama de bacterias que habitan en el rumen, cabe esperar que algunas poblaciones se adapten bien a las condiciones ambientales en CNRMR, mientras que otras no puedan crecer en las mismas condiciones. De acuerdo con esta hipótesis, los valores del número de picos y del índice de Shannon fueron menores en los CNRMR que en el inóculo para las dos dietas; además, las

muestras de los inóculos poseían 14 picos que no fueron detectados en ninguna muestra de CNRMR. Cuando se compararon las muestras por pares (inóculo para cada dieta y oveja y su correspondiente CNRMR) el número de picos que aparecieron en el inóculo y no en los CNRMR osciló entre 21 y 34, y este número no se vió afectado por la relación forraje:concentrado, tipo de forraje u oveja individual. Estos resultados parecen indicar que las condiciones ambientales en los CNRMR fueron los principales factores que influyeron en la transición de las comunidades bacterianas, y que ni las características de la dieta ni los animales donantes tuvieron gran influencia sobre el número de picos de los inóculos que no aparecieron posteriormente en los CNRMR.

El patrón de agrupamiento observado en los dendrogramas indicaría que el animal (las ovejas) tuvo un mayor efecto sobre las comunidades bacterianas que la dieta o el sistema de fermentación. En todos los casos, cada muestra de CNRMR mostró el mayor índice de similitud con su inóculo correspondiente, a excepción de muestras de la oveja 2 cuando recibió las dietas con el heno de gramíneas. Estos resultados destacan la importancia de la utilización de un inóculo de animales donantes alimentados con una dieta similar a la que se incubaba en los CNRMR cuando se llevan a cabo experimentos *in vitro*.

En resumen, aunque hubo diferencias entre las ovejas y los CNRMR en la magnitud de la mayoría de los parámetros, las diferencias entre las dietas atribuidas al tipo de forraje en los CNRMR fueron similares a las de ovejas para la mayoría de los parámetros medidos. La similitud entre las comunidades bacterianas entre el inóculo y los CNRMR fue mayor del 67% para todas las dietas, pero la menor diversidad bacteriana en los CNRMR en comparación con el líquido ruminal de las ovejas utilizado como inóculo podría indicar una selección de algunas cepas bacterianas durante el período de incubación. Por ello, la realización de análisis de los cambios en poblaciones microbianas específicas durante el período de incubación en los CNRMR sería muy útil para entender las

diferencias observadas en los parámetros fermentativos entre los sistemas *in vivo* e *in vitro* y contribuiría a la posible mejora de los sistemas de fermentación *in vitro*.

En el tercer trabajo, el último realizado con CNRMR, se valoró el efecto de tres métodos distintos de procesado (MP) del contenido ruminal sobre las poblaciones microbianas presentes en el fluido ruminal, puesto que la manipulación del inóculo influye en su actividad (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2016). El primer tratamiento consistió en un filtrado por 4 capas de gasa (Gasa), que fue utilizado como control, puesto que es el tratamiento que se realiza de manera habitual en estudios con CNRMR. El segundo fue el filtrado por gasa más un filtrado posterior por una tela de nylon de 100 micras de poro (Nylon), para eliminar las posibles partículas de alimento que pueden quedar el líquido ruminal utilizado como inóculo y que pueden influir en el patrón de fermentación. El último tratamiento consistió en el desligamiento de microorganismos asociados a la fase sólida utilizando un Stomacher® y filtrado posterior a través de cuatro capas de gasa (Sto), puesto que gran parte de microorganismos están ligados a las partículas de alimento, especialmente en animales alimentados con dietas con alto contenido en forraje (Cheng *et al.*, 1995), y es previsible que este tratamiento suponga una mejora de la simulación de la fermentación con la inclusión de los mismos. Los inóculos obtenidos después de haber realizado los diferentes tratamientos fueron utilizados para la incubación en CNRMR de 6 sustratos que diferían en el tipo de forraje (heno de alfalfa, heno de gramíneas o paja de cebada) y en la cantidad de forraje y concentrado (solo forraje (FOR) o 50:50 forraje:concentrado (FC)), para evaluar las posibles interacciones entre el MP y las características del sustrato.

Algunos estudios han investigado los efectos del MP del contenido ruminal sobre los perfiles de producción de gas (Pell y Schofield, 1993; Cone *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2004) y los parámetros de fermentación (Senshu *et al.*, 1980; Rymer *et al.*,

1999; Lee *et al.*, 2004), pero muy pocos han analizado los efectos del MP sobre la composición microbiana del rumen (Mackie *et al.*, 1983; Martínez *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2009).

El MP no afectó significativamente a la concentración de ADN total bacteriano en los líquidos ruminales obtenidos, pero este valor fue un 22,2% mayor con el método Sto que con el Gasa, lo que pudo deberse a un mayor desligamiento de las bacterias de la fase sólida. De acuerdo con esta hipótesis, Mackie *et al.* (1983) encontraron que el tratamiento de la digesta sólida ruminal con Ultra-Turrax® o Stomacher® durante 1 minuto casi duplicó el número de bacterias totales cultivables y utilizadoras de lactato en comparación con los recuentos obtenidos después de la agitación manual para suspender partículas sólidas, pero disminuyó el número de bacterias celulolíticas. La pobre anaerobiosis que se puede mantener durante la realización de tratamientos de este tipo podría explicar la falta de influencia de los MP utilizados en nuestro estudio en la mayoría de los parámetros de fermentación, a pesar de que el método Sto dio lugar a una mayor abundancia de *F. succinogenes* y *R. albus* y cantidades de bacterias totales numéricamente mayores.

Otros estudios anteriores han demostrado que el tratamiento con Sto de la digesta ruminal tiene un impacto sobre la cantidad y el perfil de las bacterias recuperadas en el líquido (Ramos *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2009) por lo que decidimos incluir dicho método en nuestro estudio, pero el tiempo de tratamiento se limitó a 3 minutos para disminuir la exposición al oxígeno, y esto puede haber reducido la cantidad de bacterias desligadas. La falta de diferencias significativas entre el inóculo Gasa y Nylon en cualquiera de las poblaciones microbianas analizadas podría indicar que las pequeñas partículas de alimento asociadas al inóculo Gasa no representan una contribución significativa para provocar cambios en la población microbiana total. La falta de diferencias entre

métodos Gasa y Nylon en cualquier parámetro de fermentación es consistente con esta hipótesis.

El MP no afectó a la diversidad (índice de Shannon) ni al número de unidades taxonómicas operacionales (OTUs; número de picos) de ningún inóculo. Sin embargo, la estructura de la comunidad bacteriana fue diferente en los distintos animales y con los diferentes MP, como muestra el dendrograma obtenido a partir del ARISA. La baja similitud de las muestras Sto con las muestras Gasa y Nylon indicaría la presencia de diferentes OTUs en este inóculo, lo que puede sugerir que la homogenización del contenido ruminal separa bacterias específicas de la fase sólida; sin embargo, únicamente 3 picos de los electroferogramas del ARISA eran exclusivos de las muestras del método Sto. El patrón de agrupamiento observado en el dendrograma de los perfiles ARISA indica que el individuo (la oveja) tuvo un mayor efecto sobre la estructura de las comunidades bacterianas que el MP, lo que coincide con lo observado previamente por otros autores en el rumen de ovinos alimentados con dietas diferentes (Saro *et al.*, 2012; Saro *et al.*, 2014a; Mateos *et al.*, 2015).

El MP afectó a la concentración total de ADN protozoario, que fue de 1,5 y 2,9 veces mayor en las muestras Gasa que en las de Nylon y Sto, respectivamente. La menor concentración de ADN protozoario en las muestras Nylon fue atribuida a la retención de los protozoos más grandes (> 100 μm) en la tela de nylon utilizada para la filtración. El inóculo Sto tuvo la concentración más baja de ADN protozoario, lo que podría ser debido al daño físico de la lábil membrana de los protozoos, permitiendo la liberación de ADN intracelular durante la homogenización y ocasionando su posterior pérdida durante la centrifugación de las muestras antes de la extracción de ADN. Estos resultados concuerdan con los de Mackie *et al.* (1983), quienes observaron que el batido del contenido ruminal durante 1 min disminuyó el recuento de protozoos ciliados en 2,3 veces en

comparación con la agitación manual como método para resuspender las partículas sólidas.

A pesar de los cambios observados en las poblaciones microbianas, los patrones de fermentación de los distintos sustratos tras 8 o 24 h de incubación se vieron afectados sólo ligeramente por los MP utilizados. Las únicas diferencias entre los métodos Gasa y Sto fueron detectadas en la producción de metano y en la digestibilidad de la materia seca (DMS). De acuerdo con nuestros resultados, Rymer *et al.* (1999) encontraron que la cinética de producción de gas y la producción de AGV con forraje como sustrato no se vieron significativamente afectadas por el batido del contenido ruminal durante 20 segundos en comparación con el filtrado del contenido ruminal a través de 4 capas de gasa, aunque el batido aumentó significativamente la degradabilidad aparente de la materia orgánica del sustrato. Del mismo modo, Bueno *et al.* (2005) observaron que la inclusión de bacterias del sólido en el inóculo ruminal no tuvo ningún efecto sobre los parámetros de la cinética de producción de gas de diferentes sustratos, pero aumentó la degradabilidad aparente de la materia orgánica. En cambio, Lee *et al.* (2004), utilizando bacterias solo de la fase sólida o solo de la fase líquida como inóculo para incubaciones de 24 h de distintos sustratos, observaron que los parámetros de la cinética de producción de gas y la producción de AGV eran mayores con el inóculo que contenía únicamente bacterias de la fase sólida. En nuestro experimento, los inóculos Gasa y Nylon contenían principalmente bacterias asociadas a la fase líquida, pero el inóculo Sto contenía también bacterias separadas de fase sólida, como lo confirma la mayor abundancia de algunas bacterias celulolíticas. El procesado del contenido ruminal para su uso como inóculo implica la exposición de los microorganismos al oxígeno, y la mayor exposición durante la homogenización pudo haber contrarrestado el efecto positivo esperado de incluir bacterias de la fase sólida en el inóculo utilizado para las fermentaciones *in vitro*.

En nuestro estudio no se encontró una correlación entre las poblaciones microbianas y los parámetros de fermentación, lo que podría explicarse por la complejidad del ecosistema microbiano del rumen y las intrincadas interacciones que se producen entre microorganismos durante el proceso fermentativo. Además, ha de remarcarse que las poblaciones microbianas y los parámetros de fermentación se vieron sólo ligeramente afectados por el MP, y esto redujo el rango de variación en los datos, limitando la detección de correlaciones entre las medidas. En cambio, en el análisis ARISA se detectaron diferencias sutiles entre MP, como se ha comentado anteriormente. La abundancia de *F. succinogenes* y *R. flavefaciens* en el inóculo se relacionó positivamente con la cantidad de metano producida (Tabla 5.1), lo que es consistente con la mayor abundancia de metanógenos y la mayor producción de metano observada para Sto en comparación con los métodos Gasa y Nylon. La relación negativa entre la abundancia de *F. succinogenes* y *R. flavefaciens* en el inóculo y el pH después de 8 h de incubación (Tabla 5.1) pudo reflejar la mayor fermentación (asociada a valores de pH más bajos) producida por los inóculos que presentaban una mayor abundancia de estas bacterias celulolíticas, puesto que el rango de valores de pH (desde 6,90 a 7,56) fue el adecuado para el crecimiento de ambas. Por último, la falta de correlación entre la abundancia de arqueas metanogénicas y la producción de metano observado en nuestro estudio (Tabla 5.1) coincide con lo reportado previamente en la literatura (Abecia *et al.*, 2012; Romero-Perez *et al.*, 2014).

	Bac	Prt	Hong	Arq	Fs	Rf	Ra
AmA					0,55 (0,07)		
AmG				-0,51 (0,09)	0,61 (0,03)	0,52 (0,08)	-0,55 (0,06)
AmS		-0,51 (0,09)			0,61 (0,03)		-0,54 (0,07)
AmF					0,66 (0,02)		
AmFC					0,57 (0,05)		-0,75 (0,004)
pHA		0,57 (0,05)		0,57 (0,05)	-0,73 (0,01)	-0,61 (0,04)	0,66 (0,02)
pHG		0,53 (0,07)			-0,65 (0,02)	-0,51 (0,09)	0,77 (0,003)
pHS				0,52 (0,08)	-0,72 (0,01)	-0,61 (0,03)	0,77 (0,003)
pHF					-0,73 (0,01)	-0,61 (0,04)	0,77 (0,003)
pHFC					-0,71 (0,01)	-0,58 (0,05)	0,74 (0,01)
AGVA						-0,68 (0,02)	
AGVG		0,62 (0,03)	0,73 (0,01)				
AGVS		0,64 (0,02)	0,71 (0,01)				
AGVF							-0,80 (0,002)
AGVFC			0,67 (0,02)				
MetA					0,72 (0,01)	0,60 (0,04)	-0,78 (0,002)
MetG					0,76 (0,004)	0,64 (0,02)	-0,78 (0,002)
MetS					0,61 (0,03)		-0,84 (0,001)
MetF					0,72 (0,01)	0,60 (0,04)	-0,81 (0,001)
MetFC					0,73 (0,01)	0,61 (0,03)	-0,84 (0,001)
AcPrA							
AcPrG				-0,59 (0,04)	0,59 (0,05)	0,57 (0,05)	
AcPrS							
AcPrF							
AcPrFC			0,62 (0,03)				-0,61 (0,03)

Tabla 5.1 Matriz de correlación (valores del coeficiente de Pearson y valores de *P* entre paréntesis) de las abundancias de los microorganismos (ADN bacteriano (Bac), ADN protozoario (Prt), abundancia relativa de hongos (Hong), arqueas (Arq), *Fibrobacter succinogenes* (Fs), *Ruminococcus flavefaciens* (Rf), *Ruminococcus albus* (Ra)) con los parámetros de fermentación (concentración de amoníaco (Am), pH, AGV totales (AGV), producción de metano (Met) y relación acético:propiónico (Ac:Pr)) en cultivos no renovados de microorganismos ruminales con tres forrajes diferentes (alfalfa (A), gramíneas (G) y paja de cebada (S)) y con diferente cantidad de forraje y concentrado (solo forraje (F) o 50:50 forraje:concentrado (FC)).

Como era de esperar, las características del sustrato incubado (FOR y FC) influyeron en su patrón de fermentación, pero la falta de interacciones significativas entre el MP y las características del sustrato indica una respuesta similar al MP de todos los sustratos. Para la mayoría de los parámetros de fermentación, los sustratos FOR, clasificados de mayor a menor valor, fueron heno de alfalfa > heno de gramíneas > paja de cebada, lo cual es consistente con su composición química. La incubación de los sustratos FC dio lugar a una mayor cantidad de productos de fermentación que los sustratos FOR a las 8 y 24 h, lo que concuerda con los patrones de fermentación en ovinos alimentados con dietas con proporciones diferentes de forraje:concentrado

En definitiva, el tratamiento con Stomacher® incrementó la abundancia de bacterias totales y celulolíticas y disminuyó la de protozoos en el líquido obtenido. El procesado del contenido ruminal para su uso como inóculo implica la exposición de microorganismos al oxígeno, y la mayor exposición por el tratamiento con Stomacher® puede haber contrarrestado el efecto positivo de la inclusión de bacterias desligadas de la fase sólida en el inóculo. Los resultados de este experimento muestran que el método de procesado del contenido del rumen para obtener el inóculo para incubaciones *in vitro* puede afectar a las poblaciones microbianas presentes en el mismo, pero esto parece afectar poco a la fermentación de sustratos de diferente composición química.

El cuarto y último trabajo de esta tesis fue planteado para evaluar la evolución de las poblaciones microbianas y de las características de la fermentación durante la incubación en fermentadores RUSITEC de dos dietas diferentes representativas de la alimentación de ganado ovino, una compuesta por 50% de heno de alfalfa y 50% de concentrado (MC; utilizada para ganado ovino lechero), y la otra compuesta por 15% de paja de cebada y 85% de concentrado (AC; utilizada en corderos de cebo). A lo largo del periodo de incubación se tomaron muestras de la fase sólida (SOL) de los fermentadores para el análisis de las comunidades

microbianas ligadas a esta fase, y se determinó la degradación del sustrato incubado y el crecimiento microbiano. En la fase líquida (LIQ), se tomaron muestras para el análisis de los microorganismos y de los principales parámetros de la fermentación, y para la valoración del crecimiento microbiano. Paralelamente, se recogieron muestras del gas producido para analizar su concentración de metano.

Desde el día 3 al 14 de incubación, las concentraciones de ADN protozoario se redujeron 9,9 y 5,7 veces en las fases SOL y LIQ con la dieta MC, y 64,1 y 11,5 veces con la dieta AC, respectivamente. En línea con nuestros resultados, también se ha observado una disminución de protozoos a lo largo del tiempo en fermentadores de flujo continuo (Muetzel *et al.*, 2009; Soto *et al.*, 2013; Martínez-Fernandez *et al.*, 2015). Una disminución del número de protozoos al aumentar el tiempo de incubación también se ha encontrado en la fase líquida de fermentadores RUSITEC (Carro *et al.*, 1992; Carro *et al.*, 1995; Martínez *et al.*, 2010c; Martínez *et al.*, 2011a), pero nuestros resultados muestran asimismo una disminución de protozoos en la fase sólida (SOL). Por otra parte, en nuestro estudio hubo una correlación significativa entre las concentraciones de ADN protozoario en el SOL y la fase LIQ de los fermentadores. El pH más bajo en los fermentadores que recibieron la dieta AC contribuyó probablemente a la reducción de la población de protozoos, ya que se ha demostrado que su número disminuye con valores de pH inferiores a 6,0 tanto *in vivo* (Franzolin y Dehority, 1996) como *in vitro* (Carro *et al.*, 1995; Martínez *et al.*, 2011a). Además, el menor tiempo de retención de la digesta sólida en los fermentadores con dieta AC (48 h para forraje y 24 horas para concentrado; 85% y el 50% de concentrado para dietas con AC y MC, respectivamente) también podría contribuir a la reducida concentración de protozoos en esta fase de la digesta, debido a que el secuestro de protozoos entre las partículas de la digesta se ha identificado como un factor

importante en el mantenimiento de su concentración (Nakamura y Kurihara, 1978).

Contrariamente a lo observado para los protozoos, las concentraciones de ADN bacteriano aumentaron con el tiempo de incubación en ambas fases de la digesta en fermentadores MC y en la fase LIQ de fermentadores AC. Ziemer *et al.*, (2000) y Soto *et al* (2013) también observaron un aumento de 1,7 y 1,2 veces en abundancia bacteriana en fermentadores de flujo continuo tras 10 y 5 días de incubación, respectivamente, mientras que Muetzel *et al* (2009) y Soto *et al.* (2012) no detectaron cambios temporales en la abundancia bacteriana en fermentadores de flujo continuo alimentados con dietas de composición variable e inoculados con contenido ruminal de vacas lecheras y cabras, respectivamente. Martínez-Fernández *et al.* (2015) observaron una disminución significativa de las concentraciones de ADN bacteriano desde el día 0 al día 4 de incubación en fermentadores de flujo continuo inoculados con contenido ruminal de cabras, aunque posteriormente las concentraciones se mantuvieron estables hasta el día 12. En el único estudio de este tipo realizado con fermentadores RUSITEC, Prevot *et al.* (1994) observaron que la fluorescencia de las bacterias de la fase líquida disminuyó marcadamente durante los primeros 2 días de incubación, pero permaneció estable hasta el final del período de incubación de 6 días. Las diferencias en la fuente del inóculo, las condiciones de manejo de los fermentadores y el tipo de dieta pueden contribuir a explicar la variabilidad de estos resultados.

Las 3 poblaciones fibrolíticas analizadas mostraron una evolución diferente a lo largo del tiempo de incubación; mientras que en el día 3 *F. succinogenes* fue la más abundante en todos los fermentadores, al final de la incubación *R. albus* fue la más abundante en fermentadores MC y *F. succinogenes* lo fue en los fermentadores AC. En fermentadores de flujo continuo, algunos autores han observado una población bastante estable de *F. succinogenes* (Ziemer *et al.*, 2000,

Muetzel *et al.*, 2009, Soto *et al.*, 2012), aunque Soto *et al.* (2013) señalaron un aumento de 17,5 veces en el día 5 de incubación. *F. succinogenes* se ha identificado como una de las bacteria celulolíticas más abundante, independientemente de la dieta, en el rumen de ovejas (Michalet-Doreau *et al.*, 2001; Saro *et al.*, 2012; Saro *et al.*, 2014b) y en CNRMR inoculados con líquido ruminal de ovejas (Chen *et al.*, 2008), observación que concuerda con nuestros resultados del día 3. Sin embargo, las condiciones en los fermentadores MC parecen haber sido más favorables para el crecimiento de ambos *Ruminococcus*, cuya abundancia se mantuvo bastante estable a lo largo del tiempo, que para *F. succinogenes*. En los fermentadores AC la abundancia de las tres bacterias celulolíticas disminuyó con el tiempo, lo que puede atribuirse en parte a los bajos valores de pH en estos fermentadores.

En varios estudios con fermentadores de flujo continuo se ha observado una población relativamente estable de metanógenos durante el período de incubación (Ziemer *et al.*, 2000; Soto *et al.*, 2012, 2013; Martínez-Fernandez *et al.*, 2015), pero en nuestro estudio observamos un aumento en la abundancia relativa de metanógenos en la fase SOL al avanzar el tiempo, lo que podría indicar que las condiciones dentro de las bolsas de nylon que contienen el alimento eran apropiadas para su crecimiento. Aunque la población de metanógenos está influenciada por muchos factores (Belanche *et al.*, 2014), algunas especies tienen tiempos de multiplicación inferiores a 5 h (Thauer *et al.*, 2008) y por lo tanto, los tiempos de retención largos del alimento en los fermentadores RUSITEC (24 y 48 h de concentrado y forraje respectivamente) no impedirían su crecimiento. Piao *et al.* (2014) confirmaron el rápido crecimiento de los metanógenos dentro de bolsas de nylon que contenían forraje (*Panicum virgatum*) después de incubar las muestras *in situ* en el rumen de una vaca lechera, y observaron que la abundancia de metanógenos a las 4 h de incubación se incrementó 3,3 veces en comparación con la existente a los 30 minutos de incubación. Sin embargo, la abundancia relativa de metanógenos en la fase LIQ de los fermentadores tendió a disminuir

durante el período de incubación para ambas dietas. Un factor que puede contribuir a la reducción de metanógenos y otros microorganismos en esta fase es la apertura diaria de los fermentadores para cambiar las bolsas que contienen los alimentos, ya que se expone el contenido al oxígeno atmosférico, que es tóxico para los microorganismos anaerobios (Tholen *et al.*, 2007). La menor abundancia de metanógenos en las fases SOL y LIQ de los fermentadores AC que en los fermentadores MC pudo estar relacionada con el pH, ya que el pH en los fermentadores MC se mantuvo en el rango de valores óptimos para la metanogénesis ruminal, pero en los fermentadores AC los valores fueron inferiores (van Kessel y Russell, 1996). La menor producción de metano observada en los fermentadores AC apoyaría esta hipótesis.

La disminución de la abundancia relativa de hongos en ambas fases de digesta observada en nuestro estudio al avanzar la incubación no coincide con el aumento de 1,5 y 23,2 veces observado por Soto *et al* (2012) y Soto *et al* (2013) en fermentadores de flujo continuo tras 7 y 5 días de incubación, respectivamente. Kostyukovsky *et al.* (1995) observaron que el número de unidades formadoras de colonias de hongos en la fase LIQ de fermentadores RUSITEC defaunados disminuyó después de la inoculación, pero posteriormente se recuperó a valores ligeramente más bajos que los encontrados en el inóculo; sin embargo, el inóculo había sido congelado a -20 °C durante 3 semanas antes de la inoculación de los fermentadores y por lo tanto los resultados no son directamente comparables con los de nuestro estudio. La mayor abundancia de hongos en fermentadores AC que en fermentadores MC fue inesperada y contradice la idea general de que las dietas altas en fibra deben promover más las poblaciones fúngicas que las dietas bajas en fibra, debido al papel relevante que tienen hongos en la degradación de la misma. Sin embargo, en diversos estudios con fermentadores de flujo continuo (Soto *et al.*, 2012) o *in vivo* (Carberry *et al.*, 2012) no se han observado diferencias

en las abundancias de hongos entre dietas con contenidos de fibra variable incubadas en.

La diversidad bacteriana en la fase SOL aumentó al avanzar el tiempo de incubación para ambas dietas, mientras que en la fase LIQ de los fermentadores permaneció sin cambios. En contraste, Soto *et al* (2012, 2013) no observaron variaciones temporales en la diversidad bacteriana en el contenido de fermentadores de flujo continuo (mezcla de SOL y LIQ) evaluada por DGGE o T-RFLP. En los dendrogramas de nuestro estudio, las muestras de inóculo formaron un grupo separado, indicando que las poblaciones bacterianas cambiaron notablemente después de la inoculación de los fermentadores. Las muestras de inóculo a su vez se dividieron según la fase de la digesta, confirmando los resultados de estudios anteriores que muestran diferencias la estructura de las comunidades bacterianas entre las fases SOL y LIQ del rumen de ovejas (Michalet-Doreau *et al.*, 2001; Saro *et al.*, 2014a).

La mayor diversidad bacteriana observada en la fase SOL de los fermentadores MC en comparación con los fermentadores AC coincide con otros estudios (Martínez *et al.*, 2010c; Larue *et al.*, 2005) que mostraron una mayor diversidad bacteriana en la fase SOL de la digesta ruminal de ovejas alimentadas con dietas forrajeras que en las que recibían dietas que incluían concentrados. La falta de diferencias entre las dietas en la diversidad bacteriana en la fase LIQ de los fermentadores concuerda con los resultados de Martínez *et al.* (2010c), quienes tampoco observaron efecto de la dieta en la diversidad bacteriana en el líquido ruminal de ovejas y fermentadores RUSITEC. En cambio, Kocherginskaya *et al.* (2001) observaron índices más altos de diversidad en la fase LIQ del rumen de novillos alimentados con maíz que en animales alimentados con heno, utilizando para ello DGGE y bibliotecas de secuencias de ADN. Se ha demostrado repetidamente que la dieta afecta al perfil de la comunidad bacteriana, pero es difícil sacar conclusiones generales. Además, la técnica de huella genética

utilizada para medir la diversidad bacteriana podría influir en los resultados obtenidos (Saro *et al.*, 2014a), lo que hace difícil una comparación directa de resultados de diferentes estudios.

La evolución de los parámetros de fermentación confirma resultados anteriores que indican que un periodo de adaptación de 8 días es suficiente para alcanzar condiciones estables en los fermentadores, porque la mayoría de parámetros muestran valores similares en los días 8 y 14 (Martínez *et al.*, 2011b). La disminución en las proporciones de propionato observadas desde el día 8 al 14 fue acompañada por un aumento en la proporción de butirato, posiblemente debido a cambios en las poblaciones bacterianas, según lo sugiere el agrupamiento de las muestras por día de muestreo en los dendrogramas. Las diferencias entre las dos dietas en los parámetros de fermentación siguieron el patrón observado *in vivo* (Ramos *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2010a) y en fermentadores de RUSITEC (Gomez *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2010a) para dietas con diferentes proporciones de concentrado. El análisis de componentes principales relaciona las muestras del SOL del día 3 de fermentadores MC con el aumento de abundancia de las tres bacterias celulolíticas, lo que está de acuerdo con la mayor abundancia de las bacterias celulolíticas observado en ovinos alimentados con dietas de alto o medio contenido de forraje en comparación con los alimentados con dietas de alto nivel de concentrado (Mosoni *et al.*, 2007). La abundancia de bacterias celulolíticas se relacionó con la proporción de butirato, pero sorprendentemente no se asoció con la proporción de acetato en dicho análisis de componentes principales. Como se ha señalado por Mossoni *et al.*, (2007), la qPCR cuantifica las células viables y no viables y, por tanto, puede no reflejar la actividad real de estas especies en el rumen en el momento del muestreo.

Otro objetivo de este estudio fue comparar la estimación del crecimiento microbiano utilizando como marcador ^{15}N con las concentraciones de ADNr

microbiano. Belanche *et al.* (2011) compararon las estimaciones de crecimiento microbiano usando bases púricas como marcador microbiano con secuencias de ADNr (DNA bacteriano y protozario) en corderos sacrificados a los 45 y 90 días de edad y, tras observar que ambos métodos detectaban diferencias similares entre grupos, concluyeron que las secuencias de ADNr microbiano podrían considerarse como posibles marcadores internos para determinar la síntesis microbiana *in vivo*. Nuestro estudio *in vitro* comparando ^{15}N y secuencias de ADNr confirmó sólo parcialmente sus resultados, ya que ambos marcadores detectaron un mayor crecimiento microbiano en los fermentadores MC que en los fermentadores AC, pero el crecimiento microbiano fue mayor en la fase SOL que en la fase LIQ con ^{15}N , mientras que lo contrario fue detectado mediante el uso de ADNr microbiano. Debe tenerse en cuenta que tanto las secuencias de ADNr como el enriquecimiento de ^{15}N fueron evaluados en las mismas muestras de la fase SOL, pero en diferentes muestras de la fase LIQ: el enriquecimiento de ^{15}N fue determinado en el efluente recogido diariamente, pero las secuencias de ADNr correspondieron a una muestra del contenido líquido de los fermentadores tomada antes de la alimentación diaria. Se precisan, por tanto, estudios que analicen las secuencias de ADNr y el enriquecimiento de ^{15}N en las mismas muestras de la fase LIQ para confirmar la idoneidad de las secuencias de ADNr como marcadores para estimar el crecimiento microbiano *in vitro*.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el sistema RUSITEC fue capaz de mantener todas las poblaciones microbianas estudiadas, pero la abundancia de la mayoría de ellas disminuyó durante el período de incubación. Los cambios microbianos difieren de los observados en fermentadores de flujo continuo, lo que ayudaría a explicar las diferencias en los parámetros de fermentación observados previamente entre los dos tipos de fermentadores cuando en ambos se utilizan dietas similares. Las distintas poblaciones microbianas encontradas en las fases sólida y líquida de nuestros fermentadores

reflejan la alta compartimentalización que se produce en el sistema RUSITEC. Como cabía esperar, la dieta tuvo también una marcada influencia sobre las poblaciones microbianas, que fue más pronunciada en la digesta sólida que en la fase líquida. Los parámetros de fermentación fueron estables durante el período de muestreo comúnmente utilizado en este tipo de experimentos (días 8 a 14), pero se detectaron algunos cambios en las poblaciones microbianas, lo que refleja las complejas interacciones entre los microorganismos del ecosistema ruminal.

Referencias bibliográficas

- Abecia, L., P. G. Toral, A. I. Martín-García, G. Martínez, N. W. Tomkins, E. Molina-Alcaide, C. J. Newbold, y D. R. Yáñez-Ruiz. 2012. Effect of bromochloromethane on methane emission, rumen fermentation pattern, milk yield, and fatty acid profile in lactating dairy goats. *J. Dairy Sci.* n. 95, pp. 2027–36.
- Belanche, A., G. de la Fuente, D. R. Yáñez-Ruiz, C. J. Newbold, L. Calleja, y J. Balcells. 2011. Technical note: The persistence of microbial-specific DNA sequences through gastric digestion in lambs and their potential use as microbial markers. *J. Anim. Sci.*, n. 89, pp. 2812–2816.
- Belanche, A., G. de la Fuente, y C. J. Newbold. 2014. Study of methanogen communities associated with different rumen protozoal populations. *FEMS Microbiol. Ecol.*, n. 90, pp. 663–77.
- Benchaar, C., A. V. Chaves, G. R. Fraser, K. A. Beauchemin, y T. A. McAllister. 2007. Effects of essential oils and their components on in vitro rumen microbial fermentation. *Can. J. Anim. Sci.*, n. 87, pp. 413–419.
- Brown, V. E., C. Rymer, R. E. Agnew, y D. I. Givens. 2002. Relationship between in vitro gas production profiles of forages and in vivo rumen fermentation patterns in beef steers fed those forages. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 98, pp. 13–24.
- Bryant, M. P. 1973. Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. *Fed. Proc.*, n. 32, pp. 1809–13.
- Bueno, I. C. S., S. L. S. Cabral Filho, S. P. Gobbo, H. Louvandini, D. M. S. S. Vitti, y A. L. Abdalla. 2005. Influence of inoculum source in a gas production method. *Vitr. Gas Prod. Tech. Limitations Oppor.*, n. 123–124, pp. 95–105.
- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, P. W. Cardozo, y C. Kamel. 2005a. Effects of Cinnamaldehyde and Garlic Oil on Rumen Microbial Fermentation in a

- Dual Flow Continuous Culture. *J. Dairy Sci.*, n. 88, pp. 2508–2516.
- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, M. D. Carro, y C. Kamel. 2005b. Effect of Garlic Oil and Four of its Compounds on Rumen Microbial Fermentation. *J. Dairy Sci.*, n. 88, pp. 4393–4404.
- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, y C. Kamel. 2006. Plant Extracts Affect In Vitro Rumen Microbial Fermentation. *J. Dairy Sci.*, n. 89, pp. 761–771.
- Carberry, C. A., D. A. Kenny, S. Han, M. S. McCabe, y S. M. Waters. 2012. Effect of phenotypic residual feed intake and dietary forage content on the rumen microbial community of beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, n. 78, pp. 4949–58.
- Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, y C. Kamel. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *J. Anim. Sci.*, n. 83, pp. 2572–2579.
- Carro, M. D., P. Lebzien, y K. Rohr. 1992. Influence of Yeast Culture on the In vitro Fermentation (Rusitec) of Diets Containing Variable Portions of Concentrates. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 37, pp. 209–220.
- Carro, M. D., P. Lebzien, y K. Rohr. 1995. Effects of Pore-Size of Nylon Bags and Dilution Rate on Fermentation Parameters in a Semicontinuous Artificial Rumen. *Small Rumin. Res.* n. 15, pp. 113–119.
- Carro, M. D., C. Valdés, M. J. Ranilla, y J. S. González. 2000. Effect of forage to concentrate ratio in the diet on ruminal fermentation and digesta flow kinetics in sheep offered food at a fixed and restricted level of intake. *Anim. Sci.*, n. 70, pp. 127–134.
- Chaves, A. V., K. Stanford, M. E. R. Dugan, L. L. Gibson, T. A. McAllister, F. Van Herk, y C. Benchaar. 2008. Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Livest. Sci.*, n. 117, pp. 215–224.
- Chen, X. L., J. K. Wang, Y. M. Wu, y J. X. Liu. 2008. Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid- and solid-associated ruminal microbes in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 141, pp. 1–14.
- Cheng, K.-J., T. A. McAllister, y J. W. Costerton. 1995. Biofilms of the ruminant digestive tract. In: H. M. Lappin-Scott y J. W. Costerton, editores. *Microbial Biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge. p. 221–232.

- Cone, J. W., A. H. van Gelder, G. J. W. Visscher, y L. Oudshoorn. 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 61, pp. 113–128.
- Franzolin, R., y B. A. Dehority. 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *J. Anim. Sci.*, n. 74, pp. 2803–2809.
- Goering, H. K., y P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analyses: apparatus, reagents, procedures, and some applications. In: Agriculture Handbook. Vol. no. 379. Agricultural Research Service, U.S. Dept. of Agriculture, Washintong, DC, EEUU.
- Gomez, J. A., M. L. Tejido, y M. D. Carro. 2005. Influence of disodium malate on microbial growth and fermentation in rumen-simulation technique fermenters receiving medium- and high-concentrate diets. *Br. J. Nutr.*, n. 93, pp. 479–484.
- Kamel, C., H. M. R. Greathead, M. L. Tejido, M. J. Ranilla, y M. D. Carro. 2008. Effects of allicin and diallyl disulfide on in vitro rumen fermentation of a mixed diet. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 145, pp. 351–363.
- van Kessel, J. A. S., y J. B. Russell. 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, n. 20, pp. 205–210.
- Klevenhusen, F., S. Duval, J. O. Zeitz, M. Kreuzer, y C. R. Soliva. 2011a. Diallyl disulphide and lovastatin: effects on energy and protein utilisation in, as well as methane emission from, sheep. *Arch. Anim. Nutr.*, n. 65, pp. 255–266.
- Klevenhusen, F., J. O. Zeitz, S. Duval, M. Kreuzer, y C. R. Soliva. 2011b. Garlic oil and its principal component diallyl disulfide fail to mitigate methane, but improve digestibility in sheep. *Greenh. Gases Anim. Agric. - Find. a Balanc. between Food Emiss.*, n. 166-167, pp. 356–363.
- Kocherginskaya, S. A., R. I. Aminov, y B. A. White. 2001. Analysis of the Rumen Bacterial Diversity under two Different Diet Conditions using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Random Sequencing, and Statistical Ecology Approaches. *Anaerobe*. n. 7, pp. 119–134.
- Kongmun, P., M. Wanapat, P. Pakdee, y C. Navanukraw. 2010. Effect of coconut oil and garlic powder on in vitro fermentation using gas production technique. *Livest. Sci.*, n. 127, pp. 38–44.
- Kongmun, P., M. Wanapat, P. Pakdee, C. Navanukraw, y Z. Yu. 2011. Manipulation of rumen fermentation and ecology of swamp buffalo by coconut oil and garlic powder supplementation. *Livest. Sci.*, n. 135, pp. 84–

92.

- Kostyukovsky, V., T. Inamoto, T. Ando, Y. Nakai, y K. Ogimoto. 1995. Degradation of hay by rumen fungi in artificial rumen (RUSITEC). *J. Gen. Appl. Microbiol.*, n. 41, pp. 83–86.
- Larue, R., Z. Yu, V. A. Parisi, A. R. Egan, y M. Morrison. 2005. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. *Environ. Microbiol.*, n. 7, pp. 530–43.
- Lee, S. S., M. B. Chang, y J. K. Ha. 2004. Effects of Bacterial Fraction and Proportion of Silage and Concentrate on Rumen Fermentation and Gas Production Profile. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* n. 17, pp. 643–647.
- Macheboeuf, Ranilla, Carro, y Morgavi. 2006. Dose-response effect of diallyl disulfide on ruminal fermentation and methane production in vitro. Proc. Fifth Jt. RRI-INRA *Gastrointest. Tract Microbiol. Symp.*, n. 46.
- Macheboeuf, D., D. P. Morgavi, Y. Papon, J.-L. Mousset, y M. Arturo-Schaan. 2008. Dose-response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 145, pp. 335–350.
- Mackie, R. I., F. M. C. Gilchrist, A. M. Robberts, P. E. Hannah, y H. M. Schwartz. 1978. Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *J. Agric. Sci.*, n. 90, pp. 241–254.
- Mackie, R. I., J. J. Theiron, F. M. C. Gilchrist, and M. Ndhiovu. 1983. Processing ruminal ingesta to release bacteria attached to feed particles. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, n. 13, pp. 52–54.
- Martínez, M. E., M. J. Ranilla, S. Ramos, M. L. Tejido, C. Saro, y M. D. Carro. 2009. Evaluation of procedures for detaching particle-associated microbes from forage and concentrate incubated in Rusitec fermenters: efficiency of recovery and representativeness of microbial isolates. *J. Anim. Sci.*, n. 87, pp. 2064–2072.
- Martínez, M. E., M. J. Ranilla, M. L. Tejido, S. Ramos, y M. D. Carro. 2010a. 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. *J. Dairy Sci.*, n. 93, pp. 3684–3698.
- Martínez, M. E., M. J. Ranilla, M. L. Tejido, C. Saro, y M. D. Carro. 2010b. The

- effect of the diet fed to donor sheep on in vitro methane production and ruminal fermentation of diets of variable composition. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 158, pp. 126–135.
- Martínez, M. E., M. J. Ranilla, M. L. Tejido, C. Saro, y M. D. Carro. 2010c. 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.*, n. 93, pp. 3699–3712.
- Martínez, M. E., M. J. Ranilla, S. Ramos, M. L. Tejido, y M. D. Carro. 2011a. Protozoa evolution in Rusitec fermenters fed diets differing in forage to concentrate ratio and forage type. *Options Méditerranéennes Serie A*, n. 99, pp. 97-102.
- Martínez, M. E., M. J. Ranilla, S. Ramos, M. L. Tejido, y M. D. Carro. 2011b. Evolution of fermentation parameters in Rusitec fermenters operated at different dilution rates and concentrate retention times. H. Ben Salem, M.D. Carro, P Morand-Fehr., y M.J. Ranilla, editores. *Options méditerranéennes.*, n. 99, pp. 121–126.
- Martínez-Fernandez, G., L. Abecia, A. I. Martín-García, E. Ramos-Morales, S. E. Denman, C. J. Newbold, E. Molina-Alcaide, y D. R. Yáñez-Ruiz. 2015. Response of the rumen archaeal and bacterial populations to anti-methanogenic organosulphur compounds in continuous-culture fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.*, n. 91 (8).
- Mateos, I., M. J. Ranilla, M. L. Tejido, C. Saro, C. Kamel, y M. D. Carro. 2013. The influence of diet type (dairy versus intensive fattening) on the effectiveness of garlic oil and cinnamaldehyde to manipulate in vitro ruminal fermentation and methane production. *Anim. Prod. Sci.*, n. 53, pp. 299–307.
- Mateos, I., M. J. Ranilla, C. Saro, y M. D. Carro. 2015. Comparison of fermentation characteristics and bacterial diversity in the rumen of sheep and in batch cultures of rumen microorganisms. *J. Agric. Sci.*, n. 153, pp. 1097–1106.
- Michalet-Doreau, B., I. Fernandez, C. Peyron, L. Millet, y G. Fonty. 2001. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod. Nutr. Dev.*, n. 41, pp. 87–94.
- Mosoni, P., F. Chaucheyras-Durand, C. Béra-Maillet, y E. Forano. 2007. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *J. Appl. Microbiol.*, n. 103, pp. 2676–85.

- Muetzel, S., P. Lawrence, E. M. Hoffmann, y K. Becker. 2009. Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 151 pp. 32–43.
- Nakamura, F., y Y. Kurihara. 1978. Maintenance of a certain rumen protozoal population in a continuous in vitro fermentation system. *Appl. Environ. Microbiol.*, n. 35, pp. 500–506.
- Patra, A. K., D. N. Kamra, y N. Agarwal. 2010. Effects of extracts of spices on rumen methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feeds in vitro. *J. Sci. Food Agric.*, n. 90, pp. 511–520.
- Patra, A. K., D. N. Kamra, R. Bhar, R. Kumar, y N. Agarwal. 2011. Effect of *Terminalia chebula* and *Allium sativum* on in vivo methane emission by sheep. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, n. 95, pp. 187–191.
- Pell, A. N., y P. Schofield. 1993. Computerized Monitoring of Gas Production to Measure Forage Digestion In Vitro. *J. Dairy Sci.*, n. 76, pp. 1063–1073.
- Piao, H., M. Lachman, S. Malfatti, A. Sczyrba, B. Knierim, M. Auer, S. G. Tringe, R. I. Mackie, C. J. Yeoman, y M. Hess. 2014. Temporal dynamics of fibrolytic and methanogenic rumen microorganisms during in situ incubation of switchgrass determined by 16S rRNA gene profiling. *Front. Microbiol.*, n. 5, pp. 307.
- Prates, A., J. A. de Oliveira, L. Abecia, y M. Fondevila. 2010. Effects of preservation procedures of rumen inoculum on in vitro microbial diversity and fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 155, pp. 186–193.
- Prevot, S., J. Senaud, J. Bohatier, y G. Prensier. 1994. Variation in the Composition of the Ruminal Bacterial Microflora during the Adaptation Phase in an Artificial Fermentor (Rusitec). *Zoolog. Sci.*, n. 11, pp. 8.
- Ramos, S., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, M. E. Martínez, C. Saro, y M. D. Carro. 2009. Influence of detachment procedure and diet on recovery of solid-associated bacteria from sheep ruminal digesta and representativeness of bacterial isolates as assessed by automated ribosomal intergenic spacer analysis-polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.*, n. 92, pp. 5659–5668.
- Ranilla, M. J., S. López, F. J. Giráldez, C. Valdés, y M. D. Carro. 1998. Comparative digestibility and digesta flow kinetics in two breeds of sheep. *Anim. Sci.*, n. 66, pp. 389–396.
- Romero-Perez, A., E. K. Okine, S. M. McGinn, L. L. Guan, M. Oba, S. M. Duval, M. Kindermann, y K. A. Beauchemin. 2014. The potential of 3-nitrooxypropanol to lower enteric methane emissions from beef cattle. *J.*

- Anim. Sci.*, n. 92, pp. 4682–93.
- Russell, J. B., y D. B. Wilson. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dairy Sci.*, n. 79, pp. 1503–9.
- Rymer, C., J. A. Huntington, y D. I. Givens. 1999. Effects of inoculum preparation method and concentration, method of inoculation and pre-soaking the substrate on the gas production profile of high temperature dried grass. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 78, pp. 199–213.
- Rymer, C., y D. I. Givens. 2002. Relationships between patterns of rumen fermentation measured in sheep and in situ degradability and the in vitro gas production profile of the diet. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 101, pp. 31–44.
- Saro, C., M. J. Ranilla, y M. D. Carro. 2012. Postprandial changes of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets varying in type of forage as monitored by real-time PCR and automated ribosomal intergenic spacer analysis. *J. Anim. Sci.*, n. 90, pp. 4487–4494.
- Saro, C., M. J. Ranilla, A. Cifuentes, R. Rossello-Mora, y M. D. Carro. 2014a. Technical note: Comparison of automated ribosomal intergenic spacer analysis and denaturing gradient gel electrophoresis to assess bacterial diversity in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.*, n. 92, pp. 1083–1088.
- Saro, C., M. J. Ranilla, M. L. Tejido, y M. D. Carro. 2014b. Influence of forage type in the diet of sheep on rumen microbiota and fermentation characteristics. *Livest. Sci.*, n. 160, pp. 52–59.
- Senshu, T., K. Nakamura, A. Sawa, H. Miura, y T. Matsumoto. 1980. Inoculum for In Vitro Rumen Fermentation and Composition of Volatile Fatty Acids. *J. Dairy Sci.*, n. 63, pp. 305–312.
- Soliva, C. R., S. L. Amelchanka, S. M. Duval, y M. Kreuzer. 2011. Ruminal methane inhibition potential of various pure compounds in comparison with garlic oil as determined with a rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.*, n. 106, pp. 114–122.
- Soto, E. C., D. R. Yáñez-Ruiz, G. Cantalapiedra-Hijar, A. Vivas, y E. Molina-Alcaide. 2012. Changes in ruminal microbiota due to rumen content processing and incubation in single-flow continuous-culture fermenters. *Anim. Prod. Sci.*, n. 52, pp. 813–822.
- Soto, E. C., E. Molina-Alcaide, H. Khelil, y D. R. Yáñez-Ruiz. 2013. Ruminal microbiota developing in different in vitro simulation systems inoculated with goats' rumen liquor. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 185, pp. 9–18.
- Staerfl, S. M., M. Kreuzer, y C. R. Soliva. 2010. In vitro screening of

- unconventional feeds and various natural supplements for their ruminal methane mitigation potential when included in a maize-silage based diet. *J. Anim. Feed Sci.*, n. 19.
- Staerfl, S. M., J. O. Zeitz, M. Kreuzer, y C. R. Soliva. 2012. Methane conversion rate of bulls fattened on grass or maize silage as compared with the IPCC default values, and the long-term methane mitigation efficiency of adding acacia tannin, garlic, maca and lupine. *Agric. Ecosyst. Environ.*, n. 148, pp. 111–120.
- Tejido, M. L., M. J. Ranilla, R. Garcia- Martínez, y M. D. Carro. 2005. In vitro microbial growth and rumen fermentation of different substrates as affected by the addition of disodium malate. *Anim. Sci.*, n. 81, pp. 31–38.
- Thauer, R. K., A.-K. Kaster, H. Seedorf, W. Buckel, y R. Hedderich. 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat. Rev. Microbiol.*, n. 6, pp. 579–91.
- Tholen, A., M. Pester, y A. Brune. 2007. Simultaneous methanogenesis and oxygen reduction by *Methanobrevibacter cuticularis* at low oxygen fluxes. *FEMS Microbiol. Ecol.*, n. 62, pp. 303–12.
- Yang, W. Z., B. N. Ametaj, C. Benchaar, y K. A. Beauchemin. 2010. Dose response to cinnamaldehyde supplementation in growing beef heifers: Ruminal and intestinal digestion. *J. Anim. Sci.*, n. 88, pp. 680–688.
- Yáñez-Ruiz, D. R., A. Bannink, J. Dijkstra, E. Kebreab, D. P. Morgavi, P. ÓKiely, C. K. Reynolds, A. Schwarm, K. J. Shingfield, Z. Yu, y A. N. Hristov. 2016. Design, implementation and interpretation of in vitro batch culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants – a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, n. 216, pp. 1–18.
- Ziemer, C. J., R. Sharp, M. D. Stern, M. A. Cotta, T. R. Whitehead, y D. A. Stahl. 2000. Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S ribosomal RNA-targeted probes. *Environ. Microbiol.*, n. 2, pp. 632–643.
- van Zijderveld, S. M., J. Dijkstra, H. B. Perdok, J. R. Newbold, y W. J. J. Gerrits. 2011. Dietary inclusion of diallyl disulfide, yucca powder, calcium fumarate, an extruded linseed product, or medium-chain fatty acids does not affect methane production in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, n. 94, pp. 3094–3104.

Capítulo 5

Capítulo 6. Conclusiones / *Conclusions*

Primera: Los efectos de dosis crecientes (20 a 540 mg/L) de aceite de ajo y cinamaldehído sobre la fermentación *in vitro* de dos dietas representativas de las que reciben los rumiantes lecheros y de cebo dependieron de la dosis de aditivo y de la dieta incubada. Se necesitaron dosis más bajas de aceite de ajo para observar efectos sobre las proporciones de ácidos grasos volátiles con la dieta leche que con la dieta de cebo (60 vs. 180 mg/L), mientras que para la producción de metano se observó la situación contraria (60 vs. 20 mg/L). La efectividad de estos dos aditivos para modificar la fermentación ruminal dependió de las características de la dieta suministrada a los animales, lo que indica la importancia de probar los aditivos con diferentes tipos de dieta.

Segunda: Al comparar los efectos de dosis crecientes (20 a 540 mg/L) de aceite de ajo y cinamaldehído en la fermentación *in vitro* de dos dietas diferentes se observaron efectos más marcados con el aceite de ajo para la misma dosis. Sin embargo, a la dosis más alta (540 mg/L) el aceite de ajo no tuvo ningún efecto negativo sobre la fermentación ruminal, mientras que el cinamaldehído inhibió la producción de ácidos grasos volátiles con las dos dietas.

Tercera: Al comparar la fermentación de diversas dietas en el rumen de ovejas y en cultivos no renovados de microorganismos ruminales se observaron diferencias en la magnitud de la mayoría de los parámetros fermentativos pero, en general, las diferencias entre dietas atribuidas al tipo de forraje observadas *in vitro* fueron similares a las encontradas *in vivo*. Sin embargo, existieron diferencias entre los dos sistemas (*in vivo* e *in vitro*) en la detección de los efectos de la relación de forraje:concentrado en algunos parámetros, como el pH, la degradabilidad de la fibra neutro detergente y la concentración total de ácidos grasos volátiles. La similitud entre las comunidades bacterianas presentes en el fluido ruminal usado como inóculo y en el contenido de los cultivos no renovados de microorganismos ruminales fue mayor del 67% para todas las dietas, pero la menor diversidad bacteriana observada *in vitro* en comparación

con el fluido ruminal de las ovejas indica una selección de determinadas bacterias durante el período de incubación.

Cuarta: Cuando se compararon tres métodos de procesado del contenido ruminal para la obtención de inóculo para incubaciones *in vitro* se observaron diferencias significativas en las poblaciones microbianas presentes en dicho inóculo. Comparado con el filtrado del contenido ruminal a través de cuatro capas de gasa, tomado como método de referencia, el tratamiento con Stomacher® incrementó la abundancia de bacterias totales y celulolíticas y disminuyó la abundancia de protozoos sin afectar a las poblaciones de hongos y arqueas metanogénicas. Sin embargo, un segundo filtrado del contenido ruminal a través de una malla de nailon de 100 µm de poro no produjo diferencias en ninguna de las poblaciones microbianas analizadas respecto al método de referencia.

Quinta: Cuando el fluido obtenido por tres métodos de procesado del contenido ruminal (filtrado por cuatro capas de gasa, filtrado por nailon de 100 µm de poro o tratado con Stomacher®) se usó como inóculo para incubaciones *in vitro* solo se observaron diferencias sutiles en la fermentación de sustratos de diferente composición química a las 8 horas de incubación, pero la mayoría desaparecieron a las 24 horas. Por ello, no se recomienda un tratamiento adicional al filtrado por cuatro capas de gasa, ya que implica un paso más en el proceso y no afecta a los parámetros fermentativos.

Sexta: En incubaciones realizadas con fermentadores RUSITEC que recibían dos dietas diferentes (leche y cebo) se observó que las poblaciones de bacterias totales, protozoos, hongos y arqueas metanogénicas presentes en el inóculo se mantuvieron durante 14 días, pero su abundancia disminuyó durante el período de incubación, con la excepción de las bacterias totales que mostraron un aumento. Las poblaciones microbianas de las fases sólida y líquida de los fermentadores fueron diferentes, reflejando la alta compartimentación en el

sistema RUSITEC, y la influencia de la dieta incubada fue más marcada en la fase sólida que en la líquida. Los parámetros fermentativos fueron relativamente estables durante el período de muestreo (días 8 a 14), pero se detectaron cambios en las poblaciones microbianas en este período, lo que demuestra las complejas interacciones que se producen entre los microorganismos ruminales.

Séptima: El uso de dos procedimientos distintos (^{15}N como marcador microbiano y secuencias de ADN_r) para estimar la síntesis de proteína microbiana en fermentadores RUSITEC produjo resultados similares al comparar las dos dietas incubadas, pero mostró resultados opuestos al comparar el crecimiento microbiano en las fases sólida y líquida de la digesta. Estos resultados se atribuyeron al diferente origen de las muestras de la fase líquida usadas en ambos procedimientos: el efluente de los fermentadores para analizar las concentraciones de ^{15}N y el contenido de los fermentadores para las secuencias de ADN_r.

First: The effects of increasing doses (20 to 540 mg/L) of garlic oil and cinnamaldehyde on *in vitro* fermentation of two diets representatives of those fed to dairy sheep and fattening lambs depended on the additive's dose and the incubated diet. Lower garlic oil doses were required to observe effects on volatile fatty acid proportions when incubated with the dairy diet, compared to fattening diet (60 *vs.* 180 mg/L), but for methane production the opposite was observed (60 *vs.* 20 mg/L). The effectiveness of these two additives to modify ruminal fermentation depended on diet characteristics supplied to the donor animals, which shows the importance of testing the additives with different diet types.

Second: Comparing the effects of increasing doses (20 to 540 mg/L) of garlic oil and cinnamaldehyde on *in vitro* fermentation of two different diets, more marked effects were observed with garlic oil, when comparing additives at the same dose. However, the highest dose (540 mg/L) of garlic oil did not have a negative effect on ruminal fermentation, while cinnamaldehyde inhibited volatile fatty acid production with both diets.

Third: Comparing the fermentation of different diets in the rumen of sheep and batch cultures of ruminal microorganisms, differences were observed in the magnitude of most parameters but, in general, the differences between diets due to forage type observed *in vitro* were similar to those found *in vivo*. However, there were differences between the two systems (*in vivo* and *in vitro*) in the interpretation of the effects of forage:concentrate ratio on some parameters, such as pH, neutral-detergent fiber degradability and total VFA concentrations. The similarity in bacterial communities between the inoculum and batch cultures of ruminal microorganisms was greater than 67% for all diets, but the lower bacterial diversity *in vitro*, compared with rumen fluid from sheep used as inoculum would indicate a selection of some bacterial strains over the incubation period.

Fourth: When three methods of processing rumen contents to obtain fluid for *in vitro* incubations were compared, significant differences were observed in microbial populations present in the inoculum. Stomacher® treatment increased the abundance of total and cellulolytic bacteria and decreased the abundance of protozoa without affecting fungi and methanogenic archaea populations, when compared with squeezing through four cheesecloth layers, used as a method of reference. Nevertheless, a second filtration through a 100 µm nylon bag did not produce differences in any analyzed microbial populations, compared to the reference method.

Fifth: When the fluid obtained with the three processing methods of rumen content (squeeze through four cheesecloth layers, filtering through 100 µm nylon bag or treated with Stomacher®) was used as inoculum for *in vitro* incubations only subtle differences were observed on substrates differing in chemical composition after 8 hours of incubation, but most of them disappeared at 24 hours. Therefore, additional treatment of the inoculum after the four cheesecloth layers squeeze is not recommended, because it implies another step in the process and does not affect the fermentation parameters.

Sixth: In RUSITEC fermenter incubations fed with two different diets (dairy and fattening) it was observed that the populations of bacteria, protozoa, fungi and methanogenic archaea existing in the inoculum were present during 14 days, but their abundance decreased along the incubation period, except for total bacteria whose abundance increased. Microbial populations in solid and liquid phases of the fermenters were different, showing the high compartmentalization in the RUSITEC system, and the influence of the incubated diet was more marked in solid than in liquid phase. The fermentation parameters remained fairly stable over the commonly used sampling period (days 8 to 14), but marked shifts in microbial populations were detected, which highlights the complex interactions among the rumen microbes.

Seventh: The use of two different processes (^{15}N as a microbial marker and rDNA sequences) for estimating microbial protein synthesis in RUSITEC fermenters produced similar results when comparing the two incubation diets, but both methods showed contrasting results for microbial growth in the solid or liquid phases of the digesta. These results were attributed to the different origins of liquid samples used in both proceedings: the fermenters' effluents to analyze ^{15}N , and the fermenters' content for rDNA sequences.

Capítulo 7. Resumen / *summary*

En esta Tesis Doctoral se realizaron varios experimentos para analizar diferentes factores que afectan a la fermentación ruminal *in vitro* y a los microorganismos ruminales que se desarrollan en cultivos no renovados de microorganismos ruminales y en fermentadores RUSITEC. El objetivo del primer estudio fue evaluar los efectos de dosis crecientes [0 (control: CON), 20, 60, 180 y 540 mg/L de medio de incubación] de aceite de ajo (GO) y cinamaldehído (CIN) sobre la fermentación ruminal *in vitro* de dos dietas. Los cultivos no renovados de microorganismos ruminales fueron inoculados con fluido ruminal procedente de cuatro ovejas alimentadas con una dieta con el 50% de concentrado (MC; 50 : 50 heno de alfalfa : concentrado) o de cuatro ovejas alimentadas con dieta alta en concentrado (AC; 15 : 85 paja de cebada : concentrado). Las dietas MC y AC fueron representativas de la alimentación de rumiantes en lactación y de cebo, respectivamente. Se utilizaron muestras de cada dieta como sustratos para su incubación *in vitro* con el inóculo de las ovejas que consumían la misma dieta. La incubación se repitió en cuatro días diferentes para obtener cuatro réplicas por tratamiento experimental. Se detectaron interacciones GO × tipo de dieta y CIN × tipo de dieta ($P < 0,001-0,05$) para la mayoría de los parámetros determinados, indicando efectos diferentes de ambos aditivos dependiendo del tipo de dieta. En general, los efectos del GO fueron más pronunciados para la dieta MC comparada con la dieta AC. La adición de GO no afectó ($P > 0,05$) a la producción total de ácidos grasos volátiles (AGV) a ninguna dosis. Para la dieta MC, el GO a 60, 180 y 540 mg/L disminuyó ($P < 0,05$) la proporción molar de acetato (608, 569 y 547 mmol/mol AGV totales, respectivamente), e incrementó ($P < 0,05$) la proporción de propionato (233, 256 y 268 mmol/mol AGV totales, respectivamente), comparado con los valores CON (629 y 215 mmol/mol AGV totales para acetato y propionato, respectivamente). Una dosis mínima de 180 mg de GO/L fue necesaria para producir modificaciones similares en las proporciones de acetato y propionato con la dieta AC, pero no se detectaron efectos ($P > 0,05$) en la proporción de butirato. La adición de dosis crecientes de

GO disminuyó linealmente la producción de metano con ambas dietas ($P < 0,001$). La relación metano/AGV se redujo ($P < 0,05$) con la administración de GO a 60, 180 y 540 mg/L para la dieta MC (0,23, 0,16 y 0,10 mol/mol, respectivamente), y con dosis de 20, 60, 180 y 540 mg/L para la dieta AC (0,19, 0,19, 0,16 y 0,08 mol/mol, respectivamente), en comparación con los valores CON (0,26 y 0,21 mol/mol para las dietas MC y AC, respectivamente). No se detectó efecto ($P = 0,16 - 0,85$) del GO sobre el pH final y las concentraciones de $\text{NH}_3\text{-N}$ y lactato con ninguna de las dietas. Para ambas dietas, la mayor dosis de CIN disminuyó ($P < 0,05$) la producción total de AGV, gas y metano, lo cual podría indicar una inhibición de la fermentación. Comparado con el CON, el CIN a 180 mg/L incrementó ($P < 0,05$) la proporción de acetato para la dieta MC (629 y 644 mmol/mol AGV totales para CON y CIN, respectivamente) y para la dieta AC (525 y 540 mmol/mol AGV totales, respectivamente) sin afectar a las proporciones de ningún otro AGV o a la producción total de AGV. Mientras que para la dieta MC el CIN a 60 y 180 mg/L disminuyó ($P < 0,05$) la concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ comparado con el CON, solo se observó una tendencia ($P < 0,10$) para el CIN a 180 mg/L con la dieta AC. La adición de CIN por encima de 180 mg/L no afectó ($P = 0,1875-0,9989$) a las concentraciones de lactato ni a la producción de gas y metano en ninguna dieta. Los resultados indican que la efectividad de GO y CIN para modificar la fermentación ruminal puede depender de la composición de la dieta, lo que tendría implicaciones prácticas de confirmarse *in vivo*.

El objetivo del segundo trabajo fue valorar la capacidad de los cultivos no renovados de microorganismos ruminales (CNRMR) para detectar las diferencias en las características de la fermentación ruminal de diferentes dietas observadas *in vivo*, y analizar los cambios en la diversidad bacteriana durante el período de incubación *in vitro*. Cuatro ovejas canuladas en el rumen y en el duodeno fueron alimentadas con cuatro dietas diferentes conteniendo una relación forraje:concentrado (RFC) de 70:30 o 30:70, con heno de alfalfa o heno de

gramíneas como forraje. El fluido ruminal de cada oveja fue usado para inocular los CNRMR que contenían la misma dieta que ingería la oveja donante, y se determinaron los principales parámetros de fermentación a las 24 horas de incubación. Hubo diferencias entre los CNRMR y el rumen de las ovejas en la mayoría de los parámetros medidos, pero los CNRMR detectaron diferencias entre dietas debidas al tipo de forraje similares a las encontradas en las ovejas. Por el contrario, los CNRMR no reprodujeron las diferencias entre dietas observadas *in vivo* debidas a la RFC para el pH, la degradabilidad de la fibra neutro detergente y la concentración total de AGV. Hubo diferencias entre los dos sistemas (*in vivo* e *in vitro*) en la mayoría de los parámetros determinados, y los CNRMR mostraron mayores valores de pH y concentraciones de $\text{NH}_3\text{-N}$, pero una menor degradabilidad de la fibra y producción de AGV y concentraciones de lactato comparados con las ovejas. Sin embargo, existieron relaciones significativas ($P < 0,05$) entre los valores *in vivo* e *in vitro* para las proporciones molares de acetato, propionato y butirato y para la relación acetato:propionato. El análisis automatizado del espacio intergénico ribosómico (ARISA) del ADN 16S ribosómico mostró que la RFC no tuvo efecto en la diversidad bacteriana ni en el fluido ruminal de ovejas usado como inóculo ni en los CNRMR. Por el contrario, la diversidad bacteriana en los inóculos fue mayor con las dietas que contenían heno de alfalfa que con las dietas de heno de gramíneas, pero la diversidad no se vió afectada por el tipo de forraje en los CNRMR. El índice de similitud entre las comunidades bacterianas en el inóculo y en los CNRMR varió del 67,2 al 74,7%, y no fue afectado por las características de la dieta. La diversidad bacteriana fue menor en los CNRMR que en los inóculos y 14 del total de 181 picos detectados en los electroferogramas del ARISA no aparecieron en las muestras de los CNRMRB. Estos resultados sugieren que las condiciones de incubación en los CNRMR podrían haber causado una selección de algunas cepas bacterianas. Sin embargo, cada muestra de CNRMR mostró el mayor índice de similitud con su correspondiente inóculo ruminal, lo cual remarca la importancia de usar fluido

ruminal de animales donantes alimentados con una dieta similar a la que va a ser incubada en los CNRMR cuando se llevan a cabo experimentos *in vitro*.

El tercer trabajo fue diseñado para valorar los efectos de diferentes métodos de procesado del contenido ruminal sobre las poblaciones microbianas en el fluido obtenido, y su influencia en los parámetros de fermentación cuando el fluido es utilizado como inóculo para incubaciones *in vitro*. El contenido ruminal fue obtenido de cuatro ovejas canuladas en el rumen y alimentadas con una dieta 2:1 heno de alfalfa:concentrado. El contenido fue sometido a los siguientes tratamientos: Gasa: filtrado a través de cuatro capas de gasa; Nylon: tratamiento Gasa y a continuación un filtrado a través de un filtro de nylon de 100- μm de poro; Sto: mezclado durante 3 min a 230 rev min⁻¹ en un Stomacher® y un filtrado posterior por cuatro capas de gasa. La abundancia de las poblaciones microbianas en los fluidos ruminales y la diversidad bacteriana fueron analizadas mediante PCR cuantitativa (qPCR) y ARISA, respectivamente. Como sustratos se utilizaron tres forrajes (heno de alfalfa, heno de gramíneas y paja de cebada) que fueron incubados *in vitro*, solos o mezclados con concentrado (1:1), utilizando cada uno de los fluidos ruminales obtenidos como inóculo. Las incubaciones duraron 8 y 24 h. No hubo diferencias entre los métodos Gasa y Nylon en ninguna de las poblaciones microbianas analizadas, pero el tratamiento Sto incrementó la abundancia relativa de *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus albus* ($P < 0,05$) y disminuyó ($P < 0,05$) la concentración de ADN protozoario comparado con el procesado Gasa. La diversidad bacteriana no se vió afectada ($P > 0,05$) por el MP. No hubo interacciones ($P > 0,05$) entre el método de procesado y las características de los sustratos para ninguno de los parámetros de fermentación analizados. Comparado con el procesado Gasa, el método Sto provocó una mayor ($P < 0,05$) producción de metano y concentración de amoníaco a las 8 horas de incubación. Después de 24 h de incubación, el uso del inóculo Sto incrementó ($P < 0,05$) la producción de metano y la

degradabilidad de la materia seca comparado con el método Gasa, sin diferencias en el resto de los parámetros. No se detectaron diferencias entre los métodos Gasa y Nylon para ningún parámetro. Los resultados muestran que el tratamiento con Stomacher® del contenido ruminal antes de la inoculación de cultivos *in vitro* modificó algunas poblaciones microbianas, pero tuvo sólo sutiles efectos sobre los parámetros de fermentación, por lo que no se recomienda como método de rutina en el laboratorio.

El cuarto experimento fue diseñado para analizar la evolución en el tiempo de las poblaciones microbianas en fermentadores RUSITEC alimentados con dietas con un contenido medio (MC; 50:50 heno de alfalfa:concentrado) o alto en concentrado (AC; 15:85 paja de cebada:concentrado). Los fermentadores RUSITEC son sistemas *in vitro* muy utilizados para el estudio de la fermentación ruminal, pero apenas existe información sobre las poblaciones microbianas que se establecen en ellos. Se recogieron muestras del contenido sólido (SOL) y líquido (LIQ) de los fermentadores los días 3, 8 y 14 de incubación para el análisis de las poblaciones microbianas mediante qPCR y ARISA. En la fase SOL, la concentración de ADN bacteriano total y la abundancia relativa de *Ruminococcus flavefaciens* permanecieron invariables durante el periodo de incubación, pero la concentración de ADN protozario y la abundancia relativa de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y los hongos disminuyeron y aumentó la abundancia relativa de las arqueas metanogénicas. En la fase LIQ, la concentración de ADN bacteriano total aumentó con el tiempo de incubación, y la concentración de ADN protozario y la abundancia relativa de los metanógenos y los hongos disminuyó. Se observaron interacciones dieta x tiempo para el ADN bacteriano y protozario y para la abundancia relativa de *F. succinogenes* y *R. albus* en la fase SOL, así como para el ADN protozario en la fase LIQ. La diversidad bacteriana en la fase SOL aumentó con el tiempo, sin que se observaran cambios en la fase LIQ. La dieta incubada ejerció un efecto

significativo en todas las poblaciones microbianas, con la excepción de las bacterias totales y la abundancia relativa de los hongos en la fase LIQ. La diversidad bacteriana fue mayor en los fermentadores MC que en los fermentadores AC en la fase SOL, pero no se detectaron diferencias en la fase LIQ. Los valores de pH, la producción diaria de AGV y CH₄ y las proporciones de isobutirato permanecieron estables durante el periodo de incubación, pero otros parámetros de fermentación variaron con el tiempo. Las relaciones observadas entre los microorganismos ruminales analizados y los parámetros de fermentación concuerdan con resultados obtenidos en estudios *in vivo*. Los parámetros de fermentación no cambiaron prácticamente desde el día 8 al 14 (período de muestreo habitual en fermentadores Rusitec), pero sí que fueron detectados cambios en las poblaciones microbianas, lo cual remarca las complejas interacciones entre la dieta y los microorganismos ruminales. El uso de ¹⁵N como marcador microbiano o de secuencias de ADN_r para estimar la síntesis de proteína microbiana ofreció similares resultados para la comparación entre dietas, pero los dos métodos presentaron resultados contrarios para el crecimiento microbiano en las fases SOL y LIQ. Serían necesarios estudios en los que se realicen muestreos del contenido de los fermentadores a diferentes tiempos después de la introducción del alimento para una mejor caracterización de la evolución temporal de los microorganismos en los fermentadores RUSITEC.

Several studies were conducted to evaluate different factors affecting the *in vitro* ruminal fermentation and the ruminal microorganisms which are developed in batch cultures and in RUSITEC fermenters. The objective of the first study was to evaluate the effects of increasing doses [0 (control: CON), 20, 60, 180 and 540 mg/L incubation medium] of garlic oil (GO) and cinnamaldehyde (CIN) on *in vitro* ruminal fermentation of two diets. Batch cultures of mixed ruminal microorganisms were inoculated with ruminal fluid from four sheep fed a medium-concentrate diet (MC; 50 : 50 alfalfa hay : concentrate) or four sheep fed a high-concentrate diet (HC; 15 : 85 barley straw : concentrate). Diets MC and HC were representative of those fed to dairy and fattening ruminants, respectively. Samples of each diet were used as incubation substrates for the corresponding inoculum, and the incubation was repeated on 4 different days (four replicates per experimental treatment). There were GO × diet- type and CIN × diet- type interactions ($P < 0.001$ – 0.05) for many of the parameters determined, indicating different effects of both oils depending on the diet type. In general, effects of GO were more pronounced for MC compared with HC diet. Supplementation of GO did not affect ($P > 0.05$) total volatile fatty acid (VFA) production at any dose. For MC diet, GO at 60, 180 and 540 mg/L decreased ($P < 0.05$) molar proportion of acetate (608, 569 and 547 mmol/mol total VFA, respectively), and increased ($P < 0.05$) propionate proportion (233, 256 and 268 mmol/mol total VFA, respectively), compared with CON values (629 and 215 mmol/mol total VFA for acetate and propionate, respectively). A minimum dose of 180 mg of GO/L was required to produce similar modifications in acetate and propionate proportions with HC diet, but no effects ($P > 0.05$) on butyrate proportion were detected. Increased amounts of GO linearly decreased ($P < 0.001$) the production of methane. Methane/VFA ratio was reduced ($P < 0.05$) by GO at 60, 180 and 540 mg/L for MC diet (0.23, 0.16 and 0.10 mol/mol, respectively), and by GO at 20, 60, 180 and 540 mg/L for HC diet (0.19, 0.19, 0.16 and 0.08 mol/mol, respectively), compared with CON (0.26 and 0.21 mol/mol for MC and HC diets, respectively). No effects ($P =$

0.16–0.85) of GO on final pH and concentrations of NH₃-N and lactate were detected. For both diet types, the highest CIN dose decreased ($P < 0.05$) production of total VFA, gas and methane, which would indicate an inhibition of fermentation. Compared with CON, CIN at 180 mg/L increased ($P < 0.05$) acetate proportion for the MC (629 and 644 mmol/mol total VFA for CON and CIN, respectively), and HC (525 and 540 mmol/mol total VFA, respectively), diets, without affecting the proportions of any other VFA or total VFA production. Whereas for MC diet CIN at 60 and 180 mg/L decreased ($P < 0.05$) NH₃-N concentrations compared with CON, only a trend ($P < 0.10$) was observed for CIN at 180 mg/L with the HC diet. Supplementation of CIN up to 180 mg/L did not affect ($P = 0.1875$ – 0.9989) lactate concentrations and production of gas and methane for any diet. The results show that effectiveness of GO and CIN to modify ruminal fermentation may depend on diet type, which would have practical implications if they are confirmed *in vivo*.

The aim of the second study was to assess how closely batch cultures of rumen microorganisms (BC) can mimic the dietary differences in fermentation characteristics found in the rumen, and to analyse changes in bacterial diversity over the *in vitro* incubation period. Four ruminally and duodenally cannulated sheep were fed 4 diets having forage:concentrate ratio (FCR) of 70:30 or 30:70, with either alfalfa hay or grass hay as forage. Rumen fluid from each sheep was used to inoculate BC containing the same diet fed to the donor sheep, and the main rumen fermentation parameters were determined after 24 h of incubation. There were differences between BC and sheep in the magnitude of most measured parameters, but BC detected differences among diets due to forage type similar to those found in sheep. In contrast, BC did not reproduce the dietary differences due to FCR found in sheep for pH, degradability of neutral detergent fibre and total VFA concentrations. There were differences between systems in the magnitude of most determined parameters and BC showed higher

pH values and NH₃-N concentrations, but lower fibre degradability and VFA and lactate concentrations compared with sheep. There were significant relationships ($P < 0.05$) between *in vivo* and *in vitro* values for molar proportions of acetate, propionate and butyrate and acetate:propionate ratio. The automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) of the 16S ribosomal DNA showed that FCR ratio had no effect on bacterial diversity either in the sheep rumen fluid used as inoculum or in BC samples. In contrast, bacterial diversity was greater with alfalfa hay diets than those with grass hay in the inoculum, but was unaffected by forage type in the BC. Similarity index between the bacterial communities in the inocula and those in the BC ranged from 67.2 to 74.7%, and was unaffected by diet characteristics. Bacterial diversity was lower in BC than in the inocula with 14 peaks out of a total of 181 detected in the ARISA electropherograms never appearing in BC samples, which suggests that incubation conditions in the BC may have caused a selection of some bacterial strains. However, each BC sample showed the highest similarity index with its corresponding rumen inoculum, which highlights the importance of using rumen fluid from donors fed a diet similar to that being incubated in BC when conducting *in vitro* experiments.

The third work was conducted to assess the effects of different processing methods (PM) of ruminal contents on microbial populations in the obtained fluid, and its influence on fermentation parameters when the fluid was used as inoculum for *in vitro* incubations. Rumen contents were obtained from 4 rumen-fistulated sheep fed a 2:1 alfalfa hay:concentrate diet and subjected to the following treatments: SQ: squeezed through four layers of cheesecloth; FL: SQ treatment and further filtration through a 100- μ m nylon cloth; STO: blended for 3 min at 230 rev min⁻¹ in a Stomacher® and further filtrations as in SQ. Microbial populations' abundance in the ruminal fluids and bacterial diversity were analysed by quantitative PCR (qPCR) and ARISA, respectively. Three forages (alfalfa hay, grass hay and barley straw) were incubated *in vitro*, either alone or

mixed with concentrate (1:1), using each of the ruminal fluids as inoculum. There were no differences between SQ and FL methods in any of the microbial populations analysed, but STO increased the relative abundance of *Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus albus* ($P < 0.05$) and decreased ($P < 0.05$) the concentration of protozoal DNA compared with SQ. Bacterial diversity was not affected ($P > 0.05$) by PM. There were no interactions ($P > 0.05$) between the PM and the characteristics of the substrates for any of the fermentation parameters analysed. Compared with SQ, the STO method resulted in greater ($P < 0.05$) methane production and ammonia-N concentrations. After 24 h of incubation, the use of STO inoculum increased ($P < 0.05$) methane production and dry matter degradability compared with SQ, with no differences in the rest of the parameters. No differences between SQ and FL methods were detected in any parameter. The results show that stomaching the rumen contents prior to inoculation of *in vitro* cultures modified some microbial populations, but had only subtle effects on fermentation parameters.

The fourth experiment was designed to assess the time evolution of microbial populations in RUSITEC fermenters fed medium- (MC; 50:50 alfalfa hay:concentrate) and high-concentrate (HC; 15:85 barley straw:concentrate) diets, due to RUSITEC fermenters are *in vitro* systems widely used to study ruminal fermentation, but little is known about the microbial populations establishing in them. Samples from solid (SOL) and liquid (LIQ) content of fermenters were taken immediately before feeding on days 3, 8 and 14 of incubation for qPCR and ARISA analyses. In SOL, total bacterial DNA concentration and relative abundance of *Ruminococcus flavefaciens* remained unchanged over the incubation period, protozoal DNA concentration and abundance of *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and fungi decreased, whereas abundance of methanogenic archaea increased. In LIQ, total bacterial DNA concentration increased with time, and concentration of protozoal DNA and abundance of methanogens and fungi

decreased. Diet x time interactions were observed for bacterial and protozoal DNA and relative abundance of *F. succinogenes* and *R. albus* in SOL, as well as for protozoal DNA in LIQ. Bacterial diversity in SOL increased with time, with no changes in LIQ. There were dietary differences in all microbial populations, with the exception of total bacteria and fungi abundance in LIQ. Bacterial diversity was higher in MC-fed than in HC-fed fermenters in SOL, but no differences were detected in LIQ. Values of pH, daily production of volatile fatty acids and CH₄ and isobutyrate proportions remained stable over the incubation period, but other fermentation parameters varied with time. The relationships among microbial populations and fermentation parameters were in well agreement with those reported in *in vivo* studies. Fermentation parameters remained fairly unchanged from day 8 to 14, but shifts in microbial populations were detected, which highlights the complex interactions between diet and rumen microbes. Using ¹⁵N as a microbial marker or rDNA sequences for estimating microbial protein synthesis offered similar results for diet comparison, but both methods presented contrasting results for microbial growth in SOL and LIQ. Studies sampling the fermenters' contents at different times after feeding are needed to better characterize the temporal evolution of microbes in RUSITEC fermenters.