



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**

**Facultad de Veterinaria**

**Departamento de Producción Animal**

**Estudios de simulación del ecosistema ruminal  
en sistemas *in vitro*: aspectos metodológicos.**

***Studies of the simulation of the ruminal ecosystem  
on in vitro systems: methodological aspects.***

***María Eugenia Martínez Peláez***

***León, 2009***





**Universidad de León**

**AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA  
TESIS PARA SU PRESENTACIÓN  
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

Las Doctoras **Dña. María Dolores Carro Travieso** y **Dña. María José Ranilla García**, como Directoras de la Tesis Doctoral titulada "**ESTUDIOS DE SIMULACIÓN DEL ECOSISTEMA RUMINAL EN SISTEMAS *IN VITRO*: ASPECTOS METODOLÓGICOS**", realizada por **Dña. María Eugenia Martínez Peláez** en el Departamento de Producción Animal, autorizan su presentación a trámite, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman, para dar cumplimiento al Art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 16 de noviembre de 2009.

Fdo.: M<sup>a</sup> Dolores Carro Travieso

Fdo.: M<sup>a</sup> José Ranilla García





**Universidad de León**

**ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO  
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y  
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)**

El Departamento de Producción Animal en su reunión celebrada el día \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2009 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “**ESTUDIOS DE SIMULACIÓN DEL ECOSISTEMA RUMINAL EN SISTEMAS *IN VITRO*: ASPECTOS METODOLÓGICOS**”, dirigida por las Dras. Dña. María Dolores Carro Travieso y Dña. María José Ranilla García, realizada por Dña. María Eugenia Martínez Peláez en el Departamento de Producción Animal, y cuyo título en inglés es el siguiente: “***STUDIES OF THE SIMULATION OF THE RUMINAL ECOSYSTEM ON IN VITRO SYSTEMS: METHODOLOGICAL ASPECTS***”.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2009.

La Secretaria,

Fdo.: \_\_\_\_\_

VºBº  
El Director del Departamento,

Fdo.: \_\_\_\_\_





## **Universidad de León**

Los trabajos que componen esta Tesis Doctoral han sido financiados por el Ministerio de Educación y Ciencia (Proyecto AGL2004-04755-C02-01).

La autora de esta Tesis Doctoral ha disfrutado, durante la realización de la misma, de una Beca de Investigación (Universidad de León) y de una Beca de Formación de Profesorado Universitario (Ministerio de Educación y Ciencia).





J. W. Czerkawski, uno de los científicos más eminentes entre los que han dedicado su carrera y gran parte de su vida (ambas, desgraciadamente, ya finalizadas) al estudio de la fermentación ruminal, dedicó su obra *An introduction to rumen studies* (libro de cabecera para muchos de los que hemos tenido que lidiar con estos asuntos) a “*todos aquellos que no trataron de desanimarme*”<sup>1</sup>.

Descubrí esta dedicatoria en casa, en una tarde revuelta de primavera, cuando mi Tesis estaba ya considerablemente avanzada y este libro pequeño, de duras tapas verdes, me había acompañado durante meses en sitios tan dispares como parques públicos (intentando estudiar mientras mi hijo me reclamaba para impulsarle en el columpio y el viento se llevaba mis notas ante la mirada curiosa de la gente), la casa de mi madre, la piscina municipal y la mesita de noche de algún hotel, entre otros. Después de haberlo abierto tantas veces, el descubrimiento de estas sencillas palabras me emocionó, porque llegaron sin esperarlas, y porque me hicieron reflexionar acerca del hecho de que para nadie (ni si quiera para una eminencia como Czerkawski) ha tenido que ser fácil encarar la carrera científica enfrentándose a un tema tan especial como es el proceso digestivo de los rumiantes. Por varias razones, de las cuales sólo citaré una, y es que muy a menudo la incomprensión por parte de los profanos es terrible. Nunca olvidaré las expresiones atónitas en el rostro de aquellas personas (ajenas a estas batallas) que osaron preguntarme cuál era el tema de mi Tesis al escuchar mis explicaciones, que con el tiempo, y dadas las curiosas reacciones por parte de mis interlocutores, fueron derivando de una detallada exposición de los procesos fermentativos ruminales a un entusiasta “*tengo unas ovejas mecánicas y las esclavizo alegremente*”, y en los últimos tiempos a un lacónico “*oh, bah, estudio la digestión de las ovejas*”.

Czerkawski no dedicó su libro a aquellas personas que lo apoyaron, sino a aquellas que *no lo desanimaron*. Pienso que esta delicada ironía describe a la perfección la soledad del científico y esa incomprensión que comenté antes. A Czerkawski, por lo que parece, algunas personas trataron de desanimarlo y otras no lo hicieron; por respeto, o porque lo querían, aunque consideraran que estaba un poco loco por estudiar con pasión el ecosistema portátil de vacas, ovejas, cabras y demás... y dedicarse a inventar y construir malolientes ingenios mecánicos que pudieran asemejarse al sistema digestivo de estos animales.

---

<sup>1</sup> *To all those who did not try to discourage me* (dedicatoria original en ingles).

A mi modestísimo nivel, a la hora de agradecer y dedicar mi Tesis, mi sentimiento es paralelo al de Czerkowski, pero voy a dar un paso más. Aunque sí es verdad que algunas personas trataron de desanimarme, y muchas otras me han ayudado con el simple hecho de no hacerlo, también hay quienes con su presencia, trabajo, conocimientos, tenacidad o amor me han proporcionado más apoyo del que probablemente imaginan en estos cuatro años de mi vida (y mi obra). Es por ello que quiero expresar mi más sincero y profundo agradecimiento:

A mis Directoras, las Doctoras M<sup>a</sup> Dolores Carro y M<sup>a</sup> José Ranilla, maestras y mentoras, por dar sentido con su ejemplo al concepto de trabajo en equipo, por su excelente labor formativa y su paciencia para guiarme por entre los vericuetos de la Ciencia, y ante todo, sobre todo, por haber entendido siempre que la elaboración de una Tesis es simplemente una parte más de la hermosa y compleja vida.

A la Universidad de León y al Ministerio de Educación y Ciencia (o como quiera que se llame en el momento de lectura de estas letras), que proporcionaron los medios económicos para que, mientras aprendía a investigar, pudiera sacar adelante a mi pequeña familia de dos.

A mi precioso hijo José Patricio, por sobrellevar mis ausencias cuando estaba “dando de comer a las ovejas”, por enseñarme a relativizar y por haber transformado radicalmente mi vara de medir el mundo, cualidades muy necesarias en general para la vida, y en particular cuando uno se decide a emprender el camino de la Ciencia. Hijo mío, no lo hemos tenido fácil, pero cuando sepas leer y comprendas lo que aquí escribo, te darás cuenta que habría resultado infinitamente más difícil de no haber sido por todas estas personas. Y en algún momento sabrás también que mi trabajo, mis conocimientos, este libro, mi propia existencia, no tendrían sentido sin ti.

A mi madre y a mi hermana (Mercedes, ambas), por cuidar de su pequeño nieto y sobrino con tanto amor y devoción cuando esta Tesis me reclamó en otros lugares, o simplemente cuando necesité detenerme a tomar aliento. Sin vuestra ayuda, mi formación como investigadora no habría sido posible y jamás podré pagaros todo lo que habéis hecho por mí. Gracias también a mi padre, José, porque sin darse cuenta hizo germinar en mi corazón el amor a lo vivo y la voraz curiosidad por cuanto me rodea. Junto con ellos, al resto de la familia, por su confianza ciega en mis capacidades intelectuales y profesionales, y por su absoluto respeto a mis decisiones personales... a menudo, lo sé, poco ortodoxas.

Al Dr. de la Barra y al Compañero Rodrigo, pastor y poeta (y esforzado porteador de piernas de dinosaurio) por imbuir de sentido todo este esfuerzo. Por su amor incondicional y su entrega, en las alegrías y en los momentos difíciles. Por su paciente labor de prospección minera en mi alma y por levantar con sus manos una casita de madera en esa isla del Sur del Mundo. Por haberse atrevido a convertir la quimera en utopía, la utopía en sueño, el sueño en realidad.

A mis Compañeras Silvia, Cristina y Marisa, por las horas de trabajo compartidas (y las no compartidas), por todo lo que hemos vivido juntas, y por haber sido artífices de tantas risas y cómplices de alguna que otra lágrima. Gracias, gracias, gracias, chicas. Y gracias también al resto de personas (y personajes) que pulularon por el departamento, la becaría o similares durante mi periodo formativo, aportándome amistad y vivencias en mayor o menor medida: Gabi, Alfonso, Ana, Grethel, Nedjoua, Areadne, Alexey, Dada... A Borja, que me conoció nerviosa recitando la lección en el colegio, y que veintitantos años después me ayudó con su vitalidad a mitigar la ansiedad en ciertos tramos de la Tesis. También a María, la persona más eficiente y de mayor calidad humana que uno puede encontrar tras el escritorio cuando se enfrenta a cuatro años de beca predoctoral y a la temible burocracia “tesil”, al Dr. Alfredo Calleja, siempre dispuesto a socorrer a l@s becarí@s cuando se nos estropeaba algún cacharro del laboratorio, martillar las cerraduras de los cajones que no funcionaban, configurar los ordenadores (o computadoras, dependiendo del grado del estropicio), enderezarnos el cuello de la bata y proveernos de caramelos masticables, y al Dr. Rodrigo Peláez, por ayudarme a conocer y comprender mejor a esos bellos seres que rodean al rumen. Y por supuesto, a los laborales y técnicos (especialmente Eva, Irene y Tino), que con su labor allanaron la mía, y a las eficientes, indispensables trabajadoras que hacían que mi mesa no acumulara polvo, que mi papelera no se desbordara y que limpiaban el rastro de barro que, sin querer, mis botas dejaban en el suelo de la becaría en el invierno.

A las ovejas *Gordi*, *nº5*, *Canchera*, *Mery*, *Claudia* y *Salvaje*, mártires de la Ciencia, que entregaron su vida para que nuestro equipo pudiera avanzar en el conocimiento de las alternativas al uso de animales experimentales. Si existe la reencarnación, os habéis merecido una vida mejor, sin duda.

Al Dr. Carlos Gonzalo Abascal, por su profesionalidad, su apoyo, su bondad infinita y su amistad sin dobleces, por darme la mano y tirar de mí cuando mis fuerzas flaqueaban (en la montaña y también dentro de mi corazón), y por nuestras largas y controvertidas charlas acerca de lo divino y lo humano (de las ovejas y también de los

hombres). Carlos, te lo prometo, seguiré buscando esa respuesta que tú encontraste hace ya tiempo...

A Eloy, por aquella conversación al lado de la catedral, ligada inexorablemente a la realización de esta Tesis y a cambiar el destino de mis pasos por el mundo. A su hermana María y a tod@s l@s compañer@s de la Fundación de Familias Monoparentales Isadora Duncan, por recogerme, ayudarme a curar mis alas y devolverme al vuelo cuando llegó el momento.

À mon «pe-père adoptif», Yves Papon, au Dr. Didier Macheboeuf et au Dr. Diego Morgavi, pour prendre soin de moi et pour me montrer tant de choses pendant mon stage à l'INRA à Clermont-Ferrand-Theix (France).

A Sara y Mari Luz, amigas, hermanas, que no se conocen entre ellas pero que me conocen muy bien a mí (aunque no tengan muy claro lo que es una Tesis Doctoral ni a qué huele una oveja mecánica) y que han estado tantos años a mi lado, con luces y sombras, como todas las cosas en la vida. Os quiero niñas. Gracias también a Paco, por las horas de baile que me liberaban de las cadenas del mundo. A Pilar, Lito, Eduardo y demás camaradas de correrías *rojeriles*, que casi siempre me entendieron, nunca me juzgaron y que mantuvieron el vínculo con la parte de mi ser ligada a los ideales, pese al siempre escaso tiempo que les pude dedicar en los últimos años.

A mis profesores, los buenos, los menos buenos, los brillantes, los pésimos. A todos y cada uno de ellos, porque han sido los principales artífices de mi formación académica, desde que entré en el colegio hasta hoy, día en que una parte de mis conocimientos se consuman en este libro. De muchos no recuerdo ni el rostro ni el nombre, otros irán conmigo para siempre, como Nati y Elena, que me soportaron impertérritas en los difíciles años de adolescencia, hablándome acerca de los sistemas vivos y la estructura del ADN, o el Dr. Juan Nieto, que grabó a fuego en mi pecho y en mi mente las nociones básicas de la Taxonomía Zoológica, con cuyas lecciones tanto disfruté, y de quien aprendí que los ídolos también son de carne y hueso. Gracias a todos por vuestro trabajo.

A Silvio, por formar parte indisoluble de mi ser, por haber acompañado con tu guitarra y con tu voz tantas y tantas horas de la realización de esta Tesis. Y por aquella llamada telefónica en San Sebastián.

A Gonzalo, mi becario gemelo, y a su maravillosa familia, que durante unos días de julio en Granada me enseñaron que el calor más intenso no proviene del sol. Doctor

Cantalapiedra-Hijar (va por tí, Pilar): la suerte está del lado de los valientes, y tú y yo lo hemos sido... lo somos. Nos vemos en tierras lejanas y a tiro de piedra del corazón.

Al Quim, pel seu suport, que va fer més lleuger el desnivell de l'últim tram d'aquesta Tesi... i per contar-me un conte.

Al resto de personas que han tenido algo que ver en la consecución de esta meta, y que por descuido o *ex profeso* no he nombrado.

A la Vida, que me ha dado tanto (Violeta Parra *dixit*).

Y a los que en algún momento *sí* trataron de desanimarme... por fracasar en el intento.



## *Loa al estudio*

¡Aprende lo elemental!

Para aquellos

cuyo tiempo ha llegado

nunca es demasiado tarde.

¡Estudia el abecedario!

No basta, pero

estúdialo, ¡No te canses!

¡Empieza! ¡Tú tienes que saberlo todo!

Estás llamado a ser un militante.

Estudia marginado, hombre del campo,

estudia, hombre en la cárcel,

estudia, mujer atada a la cocina,

estudia, sexagenario.

Estás llamado a ser un militante.

¡Ve a la escuela, desamparado!

¡Persigue el saber, muerto de frío!

¡Empuña el libro, hambriento! ¡Es un arma!

Tú tienes que gobernar.

¡No temas preguntar, compañero!

¡No te dejes convencer!

¡Compruébalo tú mismo!

Lo que no sabes por ti,

no lo sabes.

Repasa tú la cuenta,

que tú tienes que pagarla.

Apunta con tu dedo a cada cosa

y pregunta: «¿Y esto, qué es?»

Estás llamado a ser un dirigente.

***Bertolt Brecht (1933)***





*A mi negrito chico, que llegó primero;  
A mi negro grande, que llegó después;  
Ambos, para quedarse.*



## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>A</b>	heno de alfalfa / alfalfa hay
<b>AA</b>	aminoacids
<b>ADF</b>	acid detergent fibre
<b>AEPA</b>	aminoethylphosphonic acid
<b>aNDF</b>	amylase-treated NDF
<b>ANOVA</b>	analysis of variance
<b>AOAC</b>	Association of Official Analytical Chemists
<b>ARISA</b>	automated ribosomal intergenic spacer analysis
<b>ATP</b>	adenosin trifosfato
<b>BCRM</b>	batch cultures of ruminal microorganisms
<b>BW</b>	body weight
<b>°C</b>	grados Celsius
<b>C</b>	concentrado / concentrate
<b>CCF</b>	continuous culture fermenters
<b>cm</b>	centímetros
<b>CON</b>	concentrado / concentrate
<b>d</b>	día /day
<b>DAPA</b>	diaminopimelic acid
<b>DGGE</b>	denaturing gradient gel electrophoresis
<b>DL</b>	dilution rate
<b>DM</b>	dry matter
<b>DMD</b>	dry matter degradation / digestibility
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid
<b>DP</b>	detachment procedure
<b>EMG</b>	efficiency of microbial growing
<b>EMP</b>	Embden-Meyerhof-Parnas
<b>EMS</b>	efficiency of microbial synthesis
<b>F</b>	forraje / forage
<b>FISH</b>	fluorescent <i>in situ</i> hybridization
<b>FOR</b>	forraje /forage
<b>FRE</b>	tratamiento de congelación (freezing)
<b>g</b>	gravedad

<b>g</b>	gramos
<b>G</b>	heno de gramíneas /grass hay
<b>h</b>	horas
<b>HC</b>	dieta o sustrato con elevada proporción de concentrado (high concentrate)
<b>HCA</b>	dieta o sustrato con elevada proporción de concentrado con heno de alfalfa (high concentrate alfalfa)
<b>HCG</b>	dieta o sustrato con elevada proporción de concentrado con heno de gramíneas (high concentrate grass)
<b>HDL</b>	high dilution rate
<b>HF</b>	dieta o sustrato con elevada proporción de forraje (high forage)
<b>HFA</b>	dieta o sustrato con elevada proporción de forraje con heno de alfalfa (high forage alfalfa)
<b>HFG</b>	dieta o sustrato de elevada proporción en forraje con heno de gramíneas (high forage grass)
<b>ID</b>	incubation day
<b>IVGPT</b>	<i>in vitro</i> gas production techniques
<b>K</b>	grados Kelvin
<b>Kcal</b>	kilocalorías
<b>Kg</b>	kilogramos
<b>L</b>	litros
<b>LAB</b>	liquid associated bacteria
<b>LDL</b>	low dilution rate
<b>mA</b>	miliamperios
<b>MARM</b>	Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
<b>MET</b>	tratamiento con metilcelulosa
<b>mg</b>	miligramos
<b>min</b>	minutos
<b>mL</b>	mililitros
<b>mM</b>	milimolar
<b>mm</b>	milímetros
<b>mOsm</b>	miliosmoles
<b>MPN</b>	most-probable number method
<b>mV</b>	milivoltios

<b>N</b>	normal
<b>NAD<sup>+</sup></b>	nicotinamida adenín dinucleótido (oxidada)
<b>NADH</b>	nicotinamida adenín dinucleótido (reducida)
<b>NAN</b>	non ammonia nitrogen
<b>NDF</b>	neutral detergent fibre
<b>nm</b>	nanómetros
<b>nmol</b>	nanomoles
<b>OM</b>	organic matter
<b>OMD</b>	organic matter degradation/digestibility
<b>Pa</b>	pascales
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>PPG</b>	perfil de producción de gases
<b>rDNA</b>	ribosomic DNA
<b>RISA</b>	ribosomal intergenic spacer analysis
<b>RNA</b>	ribonucleic acid
<b>rRNA</b>	ribosomic RNA
<b>RT</b>	retention time
<b>Rusitec</b>	Rumen Simulation Technique
<b>s</b>	segundos
<b>SAB</b>	solid associated bacteria
<b>SEM</b>	standard error of the mean
<b>SRT</b>	solid retention time
<b>SSCP</b>	single strand conformation polymorphism
<b>STO</b>	tratamiento de desligamiento con stomacher
<b>T24</b>	tiempo de retención del concentrado de 24 horas
<b>T48</b>	tiempo de retención del concentrado de 48 horas
<b>T-RFLP</b>	terminal restriction fragment length polymorphism
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>v:v</b>	volume:volume
<b>VFA</b>	volatile fatty acids
<b>wt:vol</b>	weight:volume
<b>µL</b>	microlitros
<b>µM</b>	micromolar
<b>µmol</b>	micromoles



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>Capítulo 1. Introducción, planteamiento del problema y objetivos.....</b>	<b>33</b>
<b>Capítulo 2. Revisión bibliográfica .....</b>	<b>39</b>
2.1. Los rumiantes .....	41
2.1.1. ¿Qué es un rumiante? .....	41
2.1.2. El rumen como ecosistema .....	42
2.1.3. La rumia.....	43
2.1.4. Cómo está hecho (anatomía) y cómo funciona (fisiología) un rumen .....	44
2.1.4. 1. El pH en el rumen.....	47
2.1.4.2. Temperatura, calor, regulación.....	47
2.1.4.3. El oxígeno.....	48
2.1.4.4. Eliminación de productos .....	48
2.1.5. Los microorganismos que viven en el rumen.....	48
2.1.5.1. Dónde están los microorganismos dentro del rumen.....	51
2.1.5.2. Bacterias .....	52
2.1.5.3. Arqueas metanogénicas .....	54
2.1.5.4. Protozoos .....	55
2.1.5.5. Hongos.....	57
2.1.6. Qué comen los rumiantes y qué ocurre cuando comen. Metabolismo ruminal.....	58
2.1.7. Estimando el crecimiento microbiano .....	62
2.2. Simulando la fermentación.....	66
2.2.1. Reseña histórica. Primeros intentos.....	66
2.2.2. Segunda etapa.....	68
2.2.3. Por qué utilizar fermentadores artificiales y qué se puede hacer con ellos .....	69
2.2.4. Consideraciones previas al uso de los sistemas <i>in vitro</i> . ¿Cuál escoger?.....	70
2.2.5. ¿Cómo se clasifican los sistemas <i>in vitro</i> ? .....	70
2.2.6. Estudiando la degradabilidad ruminal en el laboratorio .....	71
2.2.7. Técnicas de producción de gas <i>in vitro</i> (IVGPT).....	74
2.2.8. Fermentadores .....	79
2.2.8.1. Sistemas continuos de flujo semicontinuo. Rusitec .....	81
2.2.8.2. Sistemas continuos de flujo continuo (simple o doble).....	83
2.2.8.3. Método VIVAR.....	84
2.2.8.4. Sistemas de cultivos modificados.....	84

2.2.8.5. Simulación en monogástricos .....	84
2.2.9. Factores que afectan a la fermentación <i>in vitro</i> .....	85
2.2.9.1. Preparación y molienda del alimento .....	85
2.2.9.2. Medio, buffer, inóculo .....	85
2.2.9.3. pH .....	87
2.2.9.4. Los aparatos .....	87
2.2.9.5. Los animales donantes .....	87
2.2.9.6. Recogida del inóculo .....	88
2.2.9.7. El transporte del inóculo al laboratorio .....	89
2.2.9.8. La preparación del inóculo .....	90
2.2.9.9. Mantenimiento de la anaerobiosis .....	91
2.2.9.10. Proporción inóculo: medio de cultivo .....	91
2.2.9.11. Duración de la incubación .....	92
2.2.9.12. Intervalo de medición y presión atmosférica en los BCRM .....	92
2.2.9.13. Estratificación en cultivos continuos .....	92
2.2.9.14. Agitación .....	93
2.2.9.15. Tamaño de muestra y tamaño de partícula en los BCRM .....	93
2.2.9.16. Tasa de dilución y tiempo de retención .....	94
2.2.9.17. Mantenimiento de los protozoos .....	97
2.2.9.18. Adaptación del sistema .....	101
2.2.9.19. Desligamiento .....	102
2.2.10. Alternativas al inóculo obtenido a través de cánulas ruminales .....	104
2.3. Comparación <i>in vivo-in vitro</i> .....	107
2.3.1. Qué se ha hecho hasta el momento .....	107
2.3.2. Técnicas moleculares como herramienta de estudio .....	110
2.3.2.1. Polimorfismo conformacional de cadena simple .....	113
2.3.2.2. Análisis de los espacios intergénicos ribosomales .....	114
<b>Capítulo 3. Material y métodos</b> .....	119
3.1. Animales experimentales .....	120
3.2. Pruebas <i>in vitro</i> .....	120
3.2.1. Sistema de fermentadores de flujo semicontinuo (Rusitec) .....	122
3.2.1.1. Descripción del sistema .....	122
3.2.1.2. Manejo del sistema .....	122
3.2.2. Sistema de cultivos discontinuos de microorganismos ruminales (BCRM) .....	128



3.3. Procesado de las muestras y análisis químicos.....	130
3.3.1. Producción de gas y su composición .....	130
3.3.2. Análisis de la composición química .....	131
3.3.3. Amoníaco .....	132
3.3.4. Láctico .....	132
3.3.5. Recuentos de bacterias totales y celulolíticas.....	133
3.3.6. Ácidos grasos volátiles .....	133
3.3.7. Análisis del enriquecimiento en <sup>15</sup> N.....	134
3.3.8. Análisis de la actividad enzimática .....	134
3.3.9. Recuento de protozoos .....	135
3.4. Técnicas moleculares.....	135
3.4. 1. Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (Single Strand Conformation Polimorphysm, SSCP) .....	135
3.4.2. Análisis automatizado de los espacios intergénicos ribosomales (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, ARISA) .....	136
<b>Capítulo 4. Pruebas experimentales</b> .....	139
4.1. Prueba 1. Evolution of fermentation parameters in Rusitec fermenters operated at different dilution rates and concentrate retention times .....	141
4.2. Prueba 2. Protozoa evolution in Rusitec fermenters fed diets differing in forage:concentrate ratio and forage type .....	153
4.3. Prueba 3. Effects of dilution rate and retention time of concentrate on efficiency of microbial growth, methane production, and ruminal fermentation in Rusitec fermenters .....	167
4.4. Prueba 4. Evaluation of procedures for detaching particle-associated microbes from forage and concentrate incubated in Rusitec fermenters: Efficiency of recovery and representativeness of microbial isolates .....	191
4.5. Prueba 5. Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. I. Digestibility fermentation parameters and efficiency of microbial protein síntesis.....	213
4.6. Prueba 6. 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 .....	247
4.7. Prueba 7. The effect of the diet fed to donor sheep on <i>in vitro</i> methane production and ruminal fermentation of diets of variable composition.....	279

<b>Capítulo 5. Discusión general</b> .....	309
<b>Capítulo 6. Conclusiones</b> .....	339
<i>Conclusions</i> .....	343
<b>Capítulo 7. Resumen</b> .....	345
<i>Summary</i> .....	353
<b>Capítulo 8. Bibliografía</b> .....	359



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> Sistema de fermentadores de flujo semicontinuo Rusitec .....	123
<b>Figura 3.2.</b> Proceso al que se sometió la digesta líquida de los fermentadores y aislamiento de las bacterias asociadas a la fase sólida (SAB).....	126
<b>Figura 3.3.</b> Proceso al que se sometió la digesta líquida de los fermentadores y aislamiento de las bacterias asociadas a la fase líquida (LAB).....	127
<b>Figura 3.4.</b> Cultivos discontinuos de microorganismos ruminales .....	130
<b>Figure 4.4.1.</b> Procedures used to detach and isolate particle-associated ruminal microorganisms (PAM) from nylon bag residues in Rusitec fermenters.....	199
<b>Figure 4.4.2.</b> Original PCR single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) gel showing profiles of microbial communities attached to forage (FOR) and concentrate (CON) incubated in Rusitec fermenters and those in the pellet obtained after different detachment procedures. ....	205
<b>Figure 4.4.3.</b> Dendrograms of PCR single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) profiles of microbial communities attached to forage (FOR) and concentrate (CON) incubated in Rusitec fermenters and those in the pellet obtained after different detachment.....	206
<b>Figure 4.5.1.</b> Ruminal pH in sheep (A) and fermenters (B) fed diets with F:C ratios of 70:30 or 30:70 and alfalfa hay or grass as forage.....	230
<b>Figure 4.5.2.</b> Total VFA concentrations in sheep (A) and fermenters (B) fed diets with F:C ratios of 70:30 or 30:70 and alfalfa hay or grass as forage.....	231
<b>Figure 4.6.1.</b> Dendrograms of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) profiles of liquid-associated (LAB) and solid-associated (SAB) bacterial communities in sheep receiving diets with F:C ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage. ....	270
<b>Figure 4.6.2.</b> Dendrograms of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) profiles of liquid-associated (LAB) and solid-associated (SAB) bacterial communities in sheep and Rusitec fermenters receiving diets with F:C ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage. ....	271
<b>Figure 4.6.3.</b> Principal component analysis generated from ARISA profiles of liquid-associated (LAB) and solid-associated (SAB) bacteria isolated from sheep or Rusitec fermenters. Sheep and fermenters received diets with F:C ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage. ....	273

**Figure 4.6.1.** Relationship between methane production estimated from volatile fatty acid production (Demeyer, 1991) and directly measured in BCRM ( $r = 0.612$ ;  $P < 0.001$ )..... 296

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b> Algunas aplicaciones de los sistemas de simulación de la fermentación <i>in vitro</i> .....	115
<b>Table 4.1.1.</b> Effects of incubation day (ID) on daily production of volatile fatty acids (VFA), ammonia-N and lactate in Rusitec fermenters fed a 30:70 alfalfa hay:concentrate diet and operated at high (HDL) or low (LDL) dilution rate and concentrate retention times of 24 (T24) or 48 (T48) h .....	147
<b>Table 4.1.2.</b> Effects of incubation day (ID) on molar proportions of acetate, propionate and butyrate in Rusitec fermenters fed a 30:70 alfalfa hay:concentrate diet and operated at high (HDL) or low (LDL) dilution rate and concentrate retention times of 24 (T24) or 48 (T48) h.....	149
<b>Table 4.1.3.</b> Effects of incubation day (ID) on acetate:propionate ratio (Ac/Pr) and molar proportions of other VFA <sup>1</sup> and caproate in Rusitec fermenters fed a 30:70 alfalfa hay:concentrate diet and operated at high (HDL) or low (LDL) dilution rate and concentrate retention times of 24 (T24) or 48 (T48) h.....	150
<b>Table 4.2.1.</b> Total protozoa numbers (x 10 <sup>3</sup> /mL) in Rusitec fermenters fed diets with forage:concentrate (F:C) ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage (FOR) and inoculated on day 0 with buffered rumen fluid from sheep .....	160
<b>Table 4.2.2.</b> Isotrichidae protozoa numbers (x 10 <sup>3</sup> /mL) in Rusitec fermenters fed diets with forage:concentrate (F:C) ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage (FOR) and inoculated on day 0 with buffered rumen fluid from sheep).....	161
<b>Table 4.2.3.</b> Entodiniinae protozoa numbers (x 10 <sup>3</sup> /mL) in Rusitec fermenters fed diets with forage:concentrate (F:C) ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage (FOR) and inoculated on day 0 with buffered rumen fluid from sheep .....	162
<b>Table 4.2.4.</b> Diplodiniinae protozoa numbers (x 10 <sup>3</sup> /mL) in Rusitec fermenters fed diets with forage:concentrate (F:C) ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage (FOR) and inoculated on day 0 with buffered rumen fluid from sheep .....	163
<b>Table 4.3.1.</b> Ingredients and chemical composition of experimental diet .....	173
<b>Table 4.3.2.</b> Effect of the retention time and dilution rate on the amount of effluent, pH values and diet apparent disappearance in Rusitec fermenters.....	178

<b>Table 4.3.3</b> Effect of the retention time and dilution rate on daily production of VFA and methane in Rusitec fermenters .....	180
<b>Table 4.3.4.</b> Effect of the retention time and dilution rate on daily production of ammonia-N and NAN, daily N flow of liquid-associated (LAM) and solid-associated microorganisms (SAM), and efficiency of microbial growth (EMG) in Rusitec fermenters .....	182
<b>Table 4.3.5.</b> Effect of the retention time and dilution rate on carboxymethylcellulase, xylanase and amylase activities in ruminal fluid in Rusitec fermenters .....	184
<b>Table 4.4.1.</b> Percentage of detachment, recovery of detached and total recovery of particle-associated microbes from forage (FOR) and concentrate (CON) incubated in Rusitec fermenters after applying different detachment procedures as determined using <sup>15</sup> N as microbial marker, and similarity index of PCR single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) profiles between substrates and microbial pellets .....	203
<b>Table 4.4.2.</b> N content and <sup>15</sup> N enrichment of microbial pellets obtained from from forage (FOR) and concentrate (CON) incubated in Rusitec fermenters after applying different detachment procedures, and growth of particle-associated microorganisms (PAM) estimated using as reference the different microbial pellets (see text for calculations).....	208
<b>Table 4.5.1.</b> Ingredients and chemical composition of the 4 experimental diets with F:C ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage.....	220
<b>Table 4.5.2.</b> Ruminal pH, NH <sub>3</sub> -N and lactate concentrations, and apparent diet digestibility in the rumen of sheep and Rusitec fermenters receiving diets differing in forage:concentrate ratio (F:C) and type of forage (FOR).....	228
<b>Table 4.5.3.</b> Ruminal VFA concentrations, molar proportions of VFA, and acetate/propionate ratio in the rumen of sheep and Rusitec fermenters receiving diets differing in forage:concentrate ratio (F:C) and type of forage (FOR).....	234
<b>Table 4.5.4.</b> Enzymatic activities in ruminal fluid from sheep and Rusitec fermenters receiving diets differing in forage:concentrate ratio (F:C) and type of forage (FOR).....	237
<b>Table 4.5.5.</b> N content and <sup>15</sup> N enrichment of liquid-associated (LAB) and solid-associated (SAB) bacteria, proportion of bacterial-N derived from NH <sub>3</sub> -N, bacterial colonization of solid digesta, microbial N flow, and efficiency of microbial synthesis (EMS) in sheep and Rusitec fermenters receiving diets differing in forage:concentrate ratio (F:C) and type of forage (FOR) .....	240

<b>Table 4.6.1.</b> Ingredients and chemical composition of the 4 experimental diets with F:C ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage.....	254
<b>Table 4.6.2.</b> Bacterial and protozoal numbers in the rumen of sheep and Rusitec fermenters receiving diets differing in forage:concentrate ratio (F:C) and type of forage (FOR).....	261
<b>Table 4.6.3.</b> Values of Shannon index and numbers of peaks detected in the ARISA electropherograms of liquid-associated (LAB) and solid-associated (SAB) bacterial pellets isolated from the rumen of sheep and Rusitec fermenters receiving diets differing in forage:concentrate ratio (F:C) and type of forage (FOR) and similarity index of ARISA profiles between LAB and SAB pellets.....	267
<b>Table 4.7.1.</b> Ingredients and chemical composition of the 4 experimental diets with F:C ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage.....	286
<b>Table 4.7.2.</b> Ruminal pH, concentrations of NH <sub>3</sub> -N, lactate and total VFA, molar proportions of VFA, protozoa numbers and enzymatic activities in rumen fluid used as inoculum for the <i>in vitro</i> incubations .....	290
<b>Table 4.7.3.</b> Influence of the diet fed to donor sheep (HFA, HFG, HCA and HCG) on <i>in vitro</i> fermentation of a 70:30 alfalfa hay:concentrate diet (HFA; 400 mg) incubated with buffered ruminal fluid for 24 h.....	291
<b>Table 4.7.4.</b> Influence of the diet fed to donor sheep (HFA, HFG, HCA and HCG) on <i>in vitro</i> fermentation of a 70:30 grass hay:concentrate diet (HFG; 400 mg) incubated with buffered ruminal fluid for 24 h.....	292
<b>Table 4.7.5.</b> Influence of the diet fed to donor sheep (HFA, HFG, HCA and HCG) on <i>in vitro</i> fermentation of a 30:70 alfalfa hay:concentrate diet (HCA; 400 mg) incubated with buffered ruminal fluid for 24 h.....	293
<b>Table 4.7.6.</b> Influence of the diet fed to donor sheep (HFA, HFG, HCA and HCG) on <i>in vitro</i> fermentation of a 30:70 grass hay:concentrate diet (HCG; 400 mg) incubated with buffered ruminal fluid for 24 h.....	294



***Capítulo 1***  
***Introducción, planteamiento del problema y***  
***objetivos***



Los animales rumiantes poseen una característica que los hace únicos: la capacidad de aprovechar los componentes fibrosos de los vegetales que para el resto de los mamíferos (con excepciones, como aquellos que fermentan la fibra en el colon, ciego o recto) resultan indigeribles. Esta capacidad de los rumiantes se produce gracias a la simbiosis que se establece entre ellos y ciertos grupos de microorganismos en el complejo ecosistema que constituye el rumen. En esta asociación, la mayor parte del alimento ingerido por el rumiante es fermentado por los microorganismos antes de pasar a tramos posteriores del tracto digestivo, modificándose considerablemente; debido a ello, la cuantificación de estos procesos constituye un punto clave para la valoración nutritiva de los alimentos, aspecto que resulta especialmente complejo en los rumiantes.

Por otra parte, el conocimiento del valor nutritivo de los alimentos es de vital importancia, pues de él depende la producción y en gran medida el bienestar de estos animales. Es por ello que, tradicionalmente, las pruebas de determinación del valor nutritivo se han realizado utilizando animales rumiantes como sujetos de experimentación, requiriéndose muchas veces la fistulación en diferentes tramos de su tracto digestivo (rumen, abomaso o duodeno, dependiendo del tipo de estudios). Esto conlleva numerosos inconvenientes, asociados a la dificultad y el elevado coste de implantación de las cánulas y el posterior mantenimiento de los animales, el personal requerido y la complejidad de controlar todos los factores (extrínsecos e intrínsecos) que les afectan.

Asimismo, hay que tener en cuenta el complejo tema ético y legal que se plantea alrededor del uso de animales con fines científicos. La Directiva 86/609/CEE, promulgada en 1986 y modificada en 2003, ya contempla la reducción del número de animales experimentales y 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)*. España se ha ido adaptando a esta Directiva mediante diferentes vías, como el Real Decreto 1201/2005 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE nº 252 de viernes 21 octubre 2005, páginas 34367-34391), englobándose así en el contexto de las directrices europeas. Con la asunción de la presidencia de la Unión por parte de España a partir de enero de 2010, son esperables nuevas leyes que regulen y acoten aún más el uso de animales para experimentación,

con lo cual podría resultar cada vez más difícil trabajar con animales fistulados, e incluso con animales vivos, aunque no sea necesario someterlos a intervenciones quirúrgicas. Pese al indudable efecto positivo que ello tendrá en el bienestar animal, estos cambios y estas leyes juegan en contra de los grupos y áreas de trabajo que dependen de los animales experimentales para avanzar en el conocimiento. Por ello, ahora y más que nunca, se hace realmente necesaria la búsqueda de alternativas que permitan reproducir de forma fiable en el laboratorio los procesos de fermentación ruminal.

Los sistemas *in vitro* para el estudio de la fermentación ruminal se comenzaron a desarrollar hace ya más de cien años. Los más simples son los cultivos discontinuos o batch cultures (BCRM), que consisten en botellas o tubos en los que se incuba líquido ruminal mezclado con una solución tampón, en anaerobiosis y manteniendo una temperatura de 39°C. Este tipo de cultivos se han usado tradicionalmente para incubaciones de corta duración (horas) o para determinar la producción de gas. Sin embargo, en los últimos años ha tomado auge su utilización, debido a algunas de sus ventajas, como son la pequeña cantidad de sustrato necesaria para incubar en cada bote, el bajo coste, la posibilidad de llevar a cabo simultáneamente muchas pruebas y repeticiones, la simplicidad en el manejo, la rapidez, la versatilidad y la posibilidad de probar numerosos tratamientos experimentales en una sola prueba. A pesar de su extendida utilización, son pocos los estudios realizados hasta el momento para analizar su potencial de simulación de la fermentación ruminal.

Los primitivos sistemas de simulación de la fermentación ruminal se fueron refinando, haciéndose más sofisticados y complejos, y se moldearon en base a las necesidades de los grupos de investigación o del objetivo experimental buscado. Estos modelos más avanzados pueden utilizarse para realizar estudios de larga duración (días o semanas), por lo que genéricamente se denominan cultivos continuos, e incorporan modificaciones como el borboteo continuo de gas, la agitación, la administración de alimento, un sistema de recogida de gases de fermentación, etc. Estos fermentadores complejos se pueden dividir en dos grupos: los de flujo continuo, cuyo principal representante es el descrito por Hoover *et al.* en 1976, y los de flujo semicontinuo, cuyo principal exponente es el Rusitec (acrónimo de Rumen Simulation Technique), descrito por Czerkawski y Breckenridge en 1977. Ambos modelos originales han sido

posteriormente modificados por estos y otros investigadores y utilizados por laboratorios y grupos de trabajo en todo el mundo.

Los fermentadores han servido para realizar una gran diversidad de estudios en nutrición de rumiantes. Por ejemplo, se han utilizado para analizar las interacciones proteína-carbohidratos de la dieta (Mansfield *et al.*, 1994; Bach *et al.*, 1999), para la valoración nutritiva de alimentos (Calsamiglia *et al.*, 1996; Tejido *et al.*, 2002; Martín García, 2001), para investigar el efecto de aditivos (Carro *et al.*, 1992; 1999; Ranilla *et al.*, 2008; Giraldo *et al.*, 2008) y de diferentes parámetros (pH, ritmo de dilución, etc.) sobre la fermentación ruminal (Hoover *et al.*, 1984; Carro *et al.*, 1995; Calsamiglia *et al.*, 2002), entre otros muchos objetivos. Otros aspectos en los se han centrado numerosas investigaciones con fermentadores son la determinación de la síntesis de proteína microbiana y los factores que la afectan (Carro y Miller, 1999). En este sentido, las dos principales ventajas son que al utilizar fermentadores no se requiere el uso de marcadores de flujo de la digesta, puesto que dicho flujo se determina directamente, y que no existe la fracción de N endógeno que llega al duodeno de los animales, la cual complica la cuantificación de la síntesis microbiana *in vivo*.

A pesar de la gran utilización de estos sistemas en el campo de la investigación, el número de estudios comparativos (*in vivo* vs. *in vitro*) llevados a cabo hasta el momento es escaso, y la mayoría de ellos se han realizado en el ganado vacuno y en fermentadores de flujo continuo (Mansfield *et al.*, 1995), existiendo una información muy limitada en el ganado ovino (Carro *et al.*, 2009). Por otra parte, el éxito en la simulación de la fermentación ruminal producida en fermentadores Rusitec podría depender del tipo de dieta que se administre a los mismos. Algunos autores (Blanchart *et al.*, 1989; Gómez *et al.*, 2005; Carro *et al.*, 2009) han observado que la simulación de la fermentación obtenida con dietas basadas en forrajes es mejor que la obtenida con dietas que incluyen una elevada proporción de concentrado. Siendo así, si se modificasen las condiciones de trabajo utilizadas en los fermentadores Rusitec (pH, ritmo de dilución, etc.) en función del tipo de dieta, podría mejorarse el potencial de simulación de la fermentación.

Adicionalmente a lo expuesto, todo parece indicar que existen diferencias entre las comunidades microbianas ruminales y las que se establecen en los fermentadores. Las más conocidas son la reducción en las comunidades de bacterias celulolíticas y la disminución drástica de los protozoos que se produce en los sistemas *in vitro* (Hoover *et*

*al.*, 1976a; Mansfield *et al.*, 1995; Carro *et al.*, 1995, Ziemer *et al.*, 2000). Sin embargo, son escasos los trabajos que han abordado el estudio de los cambios en las comunidades microbianas que se producen en los fermentadores. Además, pese a la nada despreciable información aportada por las técnicas de cultivo, las técnicas moleculares disponibles en la actualidad se presentan como una herramienta de extraordinario interés, ya que pueden contribuir a una mejor definición de la microbiota ruminal y de su dinámica en función de diversos factores, como por ejemplo el tipo de dieta y el manejo de los animales. Adicionalmente, estas técnicas pueden permitir la evaluación de distintos modelos de simulación *in vitro* de la actividad ruminal con mayor precisión que la simple medida de los parámetros fermentativos (Ziemer *et al.*, 2000).

Por todo lo anteriormente expuesto, los objetivos del presente trabajo de Tesis Doctoral fueron:

1) Analizar la evolución temporal de los parámetros fermentativos y las comunidades de protozoos en fermentadores Rusitec.

2) Analizar los efectos de cambios en el ritmo de dilución y tiempos de retención del concentrado sobre los parámetros fermentativos y la síntesis de proteína microbiana en fermentadores Rusitec.

3) Comparar distintos métodos habitualmente utilizados para el desligamiento de las bacterias asociadas a la fase sólida de la digesta en fermentadores Rusitec, con el fin de establecer cuál resulta más adecuado para la determinación de la síntesis de proteína microbiana.

4) Evaluar la capacidad de los fermentadores Rusitec para simular la fermentación ruminal del ganado ovino y mantener comunidades microbianas ruminales representativas de las observadas *in vivo*.

5) Analizar el efecto de la dieta de los animales donantes de líquido ruminal sobre la fermentación ruminal y la producción de metano en cultivos discontinuos de microorganismos ruminales.

***Capítulo 2***  
***Revisión bibliográfica***





## **2.1. Los rumiantes**

Los rumiantes en general, y las ovejas en particular, han sido y son una importantísima fuente de recursos para los seres humanos. Los datos de la encuesta nacional del MARM (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino) en diciembre de 2008 para esta área pecuaria en España arrojan una cifra de casi 20 millones de cabezas totales, cifra que, pese a ser ligeramente inferior a la de años precedentes y a la crisis que atraviesa el sector, nos da una idea de su importancia económica y productiva. Tradicionalmente, la mayoría de los sistemas de explotación de estas especies han sido de tipo extensivo o semi-extensivo, pero en los últimos años se han incrementado las explotaciones que han evolucionado hacia sistemas intensivos, por lo que en la actualidad los sistemas de explotación de la cabaña ovina son muy variados. En este sentido, es necesario buscar formas que permitan al ganadero optimizar los medios de que dispone, proporcionándole alternativas rentables a la hora de alimentar a los animales que no estén reñidas con un uso responsable de los recursos y que no comprometan ni el bienestar de los animales ni el futuro de las próximas generaciones. Esto nos conduce a la necesidad de estudiar los procesos digestivos *in vivo*, y, por ende, a buscar alternativas que permitan realizar estos estudios mediante sistemas *in vitro* que ofrezcan una simulación fidedigna de lo que ocurre en el rumen de las ovejas. En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo investigador en torno al sistema digestivo de este grupo taxonómico, haciendo posible el desarrollo de técnicas que permitan incrementar e integrar su conocimiento (Dijkstra *et al.*, 2005).

### **2.1.1. ¿Qué es un rumiante?**

Los rumiantes se encuadran taxonómicamente dentro del Reino Animalia, Filo Chordata, Clase Mammalia, Orden Ruminantia. Los animales pertenecientes a este Orden poseen una característica que los hace únicos: son capaces de alimentarse de productos vegetales (hierba, paja, etc.) que contienen carbohidratos fibrosos, como la celulosa (Cheng *et al.*, 1991) y que resultan indigestibles en el estómago del resto de mamíferos (aunque algunos presenten fermentación post-gástrica). Esta característica no es inherente a los rumiantes *per se*, sino que para poder llevar a cabo ese aprovechamiento del material vegetal han establecido una simbiosis con varios grupos de microorganismos (bacterias, arqueas, hongos y protozoos) que viven en el complejo ecosistema anaerobio que se establece dentro de su estómago, que está dividido en compartimentos con diferentes funciones, y donde gran parte del alimento ingerido es

fermentado por las comunidades microbianas antes de pasar a tramos posteriores del tracto digestivo, modificándose considerablemente (Hungate, 1966). Así, los rumiantes aprovechan los productos finales de la fermentación, principalmente los ácidos grasos volátiles (VFA) y las proteínas que están contenidas en los propios microorganismos cuando estos son digeridos en el abomaso y el intestino (Asplund, 1994). Algunas proteínas de las plantas no pueden ser utilizadas por el rumiante o son deficitarias en los aminoácidos esenciales que este necesita, y es por ello que habitualmente se dice que su flora y fauna simbiote convierte el alimento no directamente aprovechable por el animal en proteína de buena calidad.

### **2.1.2. El rumen como ecosistema**

El rumen es a menudo comparado con una cámara de fermentación comercial, la más grande del mundo, con una capacidad de millones de litros; pero para aprehender todo aquello que rodea al proceso digestivo de un rumiante es conveniente afrontar su estudio desde un enfoque menos productivista, y ver al rumen como el ecosistema que es. En él se desarrolla una comunidad microbiana constituida por una multitud de microorganismos de diferentes especies (Hungate, 1966) que permiten, en una relación simbiótica de mutualismo, al hospedador (rumiante) acceder a los nutrientes contenidos en el alimento, ofreciendo este a cambio un hábitat idóneo para el crecimiento y desarrollo de estas comunidades microbianas (Dehority y Orpin, 1997). El rumen es un ecosistema muy complejo, y no se puede comprender su funcionamiento sin tener en cuenta las diversas interacciones existentes entre los distintos microorganismos que lo habitan, que se extienden al hospedador, además de las variables que lo conforman y que, por definición, se mantienen estables a lo largo del tiempo, permitiendo así la pervivencia e interacción de las comunidades y poblaciones. En el ecosistema ruminal, más que hablar de una cadena trófica, que implica un grado de simplicidad difícil de encontrar en el medio natural, se puede decir que existe una red trófica, concepto más complejo y que se acerca más a las verdaderas relaciones existentes entre los habitantes del rumen. Pese a todo, el rumen es un ecosistema más sencillo de estudiar que otros (Brock, 1966), puesto que en él hay variables más sencillas o relativamente más fáciles de controlar que en otros sistemas naturales. El biotopo ruminal permite el crecimiento sólo de aquellos microorganismos para quienes la biocenosis presenta unas condiciones óptimas (Ørskov, 1987). De entre estas condiciones, las más importantes son:

- La temperatura, que se mantiene alrededor de los 39°C

- El pH, con valores que pueden oscilar entre 5 y 7,2
- La osmolaridad, alrededor de 300 mOsm/ L
- El potencial redox, entre -200 y -450mV
- La anaerobiosis
- El movimiento, gracias a las contracciones ruminales
- La eliminación de productos finales y de desecho, por absorción y mediante paso a tramos posteriores del tracto digestivo
- La entrada de alimento, que puede ser más o menos regular

Cuando se da de comer a un rumiante, en realidad se está alimentando también a sus microorganismos simbioses. Es lógico pensar que cualquier factor que afecte a la biocenosis ruminal desembocará en cambios en los parámetros fermentativos, y como consecuencia, en diferente aprovechamiento de los nutrientes por parte del animal, hecho que afectará a su productividad. Los cambios en las condiciones ambientales pueden ser capaces de alterar el ecosistema ruminal, tanto *in vivo* como *in vitro* (Boguhn, 2004, Boguhn *et al.*, 2006a, b).

### **2.1.3. La rumia**

Los rumiantes tragan el alimento prácticamente sin masticar, sometiéndolo posteriormente al proceso de rumia, que consiste en la regurgitación de parte del contenido ruminal, que llega hasta la boca, donde es nuevamente masticado e insalivado antes de ser deglutido (Van Soest, 1994). Una vez que el alimento llega a la cavidad bucal el animal traga la fracción líquida del bolo, y procede a la masticación e insalivación cuidadosas del material sólido. Este proceso permite la disgregación mecánica del alimento reduciéndose el tamaño medio de las partículas, lo cual favorece el posterior ataque de microorganismos en el rumen, y además se extraen componentes solubles, aunque existe controversia respecto a esta función (Czerkawski, 1986). El tiempo que el animal dedica a la rumia es directamente proporcional a la cantidad de fibra en la dieta; la frecuencia y la duración de las fases de la rumia dependen en gran medida del tipo de alimento, y varía desde unos pocos minutos al día cuando el animal recibe dietas muy concentradas hasta muchas horas cuando la dieta se basa en alimentos muy fibrosos.

Mediante la rumia y las contracciones del rumen se facilita la colonización microbiana de los sustratos, porque se rompen las estructuras vegetales que impedían el acceso de las enzimas liberadas por los microorganismos al interior de los tejidos,

creándose además un flujo de nutrientes gracias a los líquidos que circulan a través de la trama sólida de la digesta.

Los alimentos permanecen un tiempo variable en el rumen, desde menos de 15 horas (los más digestibles) hasta más de dos días (los más fibrosos), y la velocidad de paso está determinada por el tiempo necesario para que el tamaño de las partículas les permita pasar por el orificio retículo-omasal (1-2 mm). Este tiempo dependerá, por tanto, del tipo de alimento, del contenido en fibra del mismo y de su forma de presentación. Así, el proceso de troceado, picado, molido, etc. de los alimentos favorece un tránsito más rápido, pero al reducirse el tiempo de interacción con los microorganismos, puede disminuir su digestibilidad.

#### **2.1.4. Cómo está hecho (anatomía) y cómo funciona (fisiología) un rumen**

Aunque tradicionalmente los estudios de la digestión de los rumiantes se han centrado en lo que ocurre en el interior del rumen, por ser el lugar donde se establecen la mayor parte de las comunidades microbianas y por tanto donde tienen lugar la mayoría de las reacciones de fermentación, en él pueden diferenciarse cuatro divisiones anatómicas y funcionales. Existen tres preestómagos denominados retículo, rumen y omaso, y un cuarto compartimento, el abomaso, que es el verdadero estómago glandular, semejante al que poseen los monogástricos. El retículo y el rumen habitualmente son denominados retículo-rumen, debido a su estrecha relación física y funcional (Hofmann, 1988). El rumen es el más grande de los preestómagos, ocupando tres cuartas partes de la cavidad abdominal; tiene cuatro compartimentos llamados sacos, separados por fuertes pilares musculares, responsables de las contracciones ruminales. La mucosa que lo recubre internamente es un epitelio estratificado no glandular (también presente en retículo y omaso) con papilas filiformes de tamaño variable, cuya función es aumentar la superficie de absorción de nutrientes. El crecimiento de papilas ruminales se estimula por la presencia de VFA, de manera que los animales alimentados con productos ricos en carbohidratos rápidamente degradables producen gran cantidad de VFA y desarrollan papilas ruminales largas, mientras que los animales alimentados con alimentos muy fibrosos presentan papilas cortas. El retículo está situado cranealmente al rumen, y se separa de él mediante el pliegue retículo-ruminal, que permite el paso libre de partículas entre los dos preestómagos. En este compartimento, la mucosa presenta pliegues en forma de celdas hexagonales. El omaso está situado a la derecha del rumen, y comunica con él mediante el orificio retículo-omasal, y con el abomaso por el orificio abomaso-omasal. La mucosa de este

compartimento forma papilas longitudinales y anchas, en forma de hoja, que absorben agua y minerales e impiden el paso de partículas de gran tamaño al abomaso (Asplund, 1994). El omaso funciona como una bomba que impulsa el alimento desde el retículo hasta el abomaso. El orificio retículo-omasal se abre totalmente en la segunda fase de la contracción primaria o de mezclado, gracias a la contracción del retículo. Posteriormente, el orificio se cierra y el contenido llena el cuerpo del omaso distribuyéndose entre sus papilas. Por último, se produce una contracción que desplaza el contenido líquido hacia el abomaso. El contenido omasal tiene un tamaño de partícula similar al presente en el retículo y rumen, y en esta zona se siguen produciendo procesos fermentativos. Por otra parte, las hojas del cuerpo del omaso ofrecen una gran área de absorción de ácidos grasos,  $\text{HCO}_3^-$  y agua. El abomaso se localiza en el costado derecho del animal y tiene forma de saco. Tiene una actividad glandular similar a la del estómago de los no rumiantes (Van Soest, 1994), pues secreta mucus, pepsinógeno y HCl gracias a su mucosa, que es glandular, y posee un sistema de pliegues en dirección caudal que aumentan la superficie e impiden que la digesta sea devuelta al omaso. A diferencia del estómago de los monogástricos, el abomaso de los rumiantes recibe un flujo continuo del contenido de los tramos anteriores. La motilidad del abomaso sirve para mezclar su contenido, y en la región pilórica los movimientos peristálticos permiten transportarlo hasta el duodeno. Cuando el animal consume alimento aumentan las contracciones, que se inhiben cuando en el duodeno se detectan distensiones, ácidos y soluciones hiperosmóticas e hiposmóticas. En su extremo posterior se localiza el píloro o esfínter duodenal, que controla el flujo de digesta hacia el intestino delgado.

Al nacimiento, el rumiante presenta un retículo-rumen muy pequeño y que no es funcional, ya que no hay microorganismos suficientes para producir los procesos fermentativos. Una vez fuera del cuerpo de su madre, el neonato se inocula con las bacterias que están en el ambiente, entre ellas la flora y fauna ruminales. Por otra parte, en el recién nacido el abomaso no puede secretar ni pepsinógeno ni HCl, favoreciéndose así la absorción de las gamma-globulinas presentes en el calostro. Los primeros días tras el nacimiento, la saliva del lactante contiene lipasa, que favorece la degradación de las grasas, y en el abomaso se forma, gracias a la acción enzimática del cuajo, un coágulo lácteo compuesto por grasa, caseinato y suero (con albúminas, globulinas y lactosa). Ante el estímulo de los receptores en faringe y el que produce la succión de la mama, se induce por vía vagal el cierre del surco esofágico, que es una vía directa que permite el paso de la leche desde el cardias hacia el orificio retículo-omasal. Conforme el animal

va consumiendo alimentos sólidos digeribles se van produciendo VFA que favorecen el crecimiento de las papilas ruminales, se seleccionan en el rumen los microorganismos que van entrando desde el exterior, y aumenta paulatinamente la secreción salival. Cuando el ternero, cordero, etc. comienza a ingerir alimentos fibrosos, se van desarrollando el resto de los compartimentos, gracias a la estimulación mecánica que producen las fibras sobre las paredes del rumen. Paulatinamente se favorece el desarrollo de la musculatura retículo-ruminal, desaparece el reflejo del surco esofágico y se produce la sustitución del cuajo por pepsinógeno.

El contenido ruminal no forma una mezcla homogénea, ya que está estratificado de acuerdo a la diferente densidad de sus componentes (Cunningham, 1994). En la zona dorsal hay una capa gaseosa, fundamentalmente con CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> producidos durante la fermentación. En el estrato inferior adyacente se encuentran partículas gruesas de forraje entremezcladas con los gases, y se le denomina capa sólida. En esta región hay una alta concentración de microorganismos que van degradando las partículas de alimento en otras de menor tamaño. Las partículas de tamaño intermedio en proceso de fermentación se organizan en una capa inferior denominada capa semi-sólida o fangosa; de esta zona procederá el alimento que será regurgitado para la rumia, por lo que en ella hay una zona de expulsión. Finalmente, en la zona ventral se encuentra la capa líquida, con partículas de pequeño tamaño en suspensión. De esta zona procederá el material que pasará al omaso, a través de la denominada zona de escape.

Para mantener la actividad ruminal es necesario una gran movilidad de las paredes del rumen en la que se produzca una buena mezcla del contenido ruminal, se facilite la eliminación de los productos de fermentación (VFA y gases) y se permita el tránsito del contenido hacia la boca o hacia regiones gástricas posteriores. Para ello, el rumen desarrolla unos movimientos secuenciales que se clasifican en dos tipos: primarios o de mezclado y secundarios o de eructación. Gracias a las contracciones primarias el contenido se mueve y se mezcla; de esta forma, el líquido se desplaza a través del sólido, arrastrando partículas solubles y microorganismos, y permitiendo una mejor colonización y disgregación del alimento (Van Soest, 1994). Las contracciones secundarias facilitan la rumia y la expulsión de gases por eructación, cuando se contrae el saco dorsal del rumen y se relaja el cardias.

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 en el proceso de alimentación como

en el de rumia, y provocan de forma refleja un aumento de la frecuencia de las contracciones retículo-ruminales. Existen otros receptores de presión que miden el grado de distensión de la capa muscular del rumen, abomaso e intestino. Cuando estos receptores detectan la distensión de los pilares del rumen favorecen la motilidad ruminal, pero cuando esta distensión es muy grande, los receptores hacen que cese. Los alimentos forrajeros distienden más las paredes del rumen, y en consecuencia favorecen la motilidad ruminal y los procesos fermentativos que los alimentos concentrados. En las paredes del rumen hay también receptores de tipo químico que detectan cambios en el pH, la concentración de VFA y la osmolaridad. Cuando el pH se reduce por aumento de las concentraciones de ácidos se inhiben la motilidad ruminal y los procesos fermentativos.

#### 2.1.4.1. El pH en el rumen

Al ser el rumen un ecosistema anaerobio, en su interior se produce una fermentación de azúcares que da lugar a la formación de VFA y otros ácidos orgánicos. Cuando estos ácidos son liberados al medio, el pH desciende (Czerkawski, 1986). Sin embargo, el pH ruminal habitualmente se mantiene cerca de la neutralidad, entre valores de 6 y 7 (aunque puede alcanzar puntualmente valores cercanos a 5 con dietas basadas en carbohidratos de degradación rápida). El mantenimiento del pH es posible gracias a la absorción de VFA a través de las paredes del rumen y a la amortiguación de la acidez por parte de la saliva, que actúa como tampón porque posee gran cantidad de fosfatos y bicarbonatos. Una oveja puede producir entre 10 y 15 litros de saliva al día (Czerkawski, 1986).

#### 2.1.4.2. Temperatura, calor, regulación

La fermentación ruminal es un proceso exotérmico que libera energía; entre un 4 y un 12% de la energía bruta de los alimentos se disipa en el rumen en forma de calor (Marston 1948; Blaxter 1967), de forma que si este estuviera aislado, la temperatura podría alcanzar los 50° C en un día (Czerkawski, 1986). Sin embargo, como todos los animales homeotermos, los rumiantes mantienen su temperatura corporal constante. Gracias a la irrigación de las paredes del rumen, el calor se dirige a través de la sangre hasta la piel, que actúa como refrigerador. El peristaltismo ruminal evita, además, el sobrecalentamiento de las partes internas.

#### 2.1.4.3. El oxígeno

En el rumen, pese a ser un ecosistema anaerobio, entra O<sub>2</sub> de forma más o menos regular. Las vías de oxigenación son el agua de bebida y la saliva, con un alto nivel de saturación en O<sub>2</sub> (100 mL/ d en ovejas), la rumia, que expone el contenido ruminal al O<sub>2</sub> atmosférico, y la difusión del O<sub>2</sub> plasmático a través de las paredes del rumen, que puede alcanzar los 10-20 mL/ d en ovejas (Czerkawski, 1986). Los niveles de anaerobiosis se mantienen mediante la absorción de O<sub>2</sub> a través de las paredes ruminales y de la utilización de este como aceptor de electrones por las bacterias anaerobias facultativas de la flora epimural (Czerkawski y Breckenridge, 1979b).

#### 2.1.4.4. Eliminación de productos

Para que el rumen funcione correctamente, los productos de fermentación no deben acumularse de forma excesiva. Los gases producidos (principalmente CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>, aunque también hay pequeñas cantidades de N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>) forman pequeñas burbujas, que van aumentando de tamaño hasta ser eliminadas por el orificio retículo ruminal y del cardias, mediante las contracciones del rumen, expulsándose silenciosamente a través de las vías respiratorias.

Los VFA se eliminan por absorción directa a través de las paredes del rumen, siendo esta la principal vía de salida, y mediante el paso del contenido ruminal a tramos posteriores del tracto gastrointestinal (entre un 10 y un 20% de los VFA producidos según Weston y Hogan, 1968). El ritmo de salida vendrá determinado por la tasa de renovación del líquido, que depende a su vez del volumen de agua ingerida, la saliva y la difusión de agua desde el plasma sanguíneo. El H<sub>2</sub> es utilizado por las arqueas metanogénicas junto con el CO<sub>2</sub> para formar CH<sub>4</sub>, lo cual permite mantener el potencial redox y que el NADH se pueda transformar en NAD<sup>+</sup>, imprescindible en los procesos de fermentación ruminal (Doré y Gouet, 1991).

#### **2.1.5. Los microorganismos que viven en el rumen**

Los microorganismos ruminales, gracias a sus capacidades fisicoquímicas, transforman el alimento en otros compuestos: VFA, ácido láctico, etanol, NH<sub>3</sub>, urea, H<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>, entre otros, mediante un proceso de fermentación anaerobia. Parte de la energía del sustrato queda en algunos de estos compuestos, mientras que otra parte se pierde. El hospedador aprovecha algunos de estos productos finales, absorbiéndolos de forma activa (como el transporte de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>) y pasiva (como la absorción de VFA, NH<sub>3</sub>, urea y H<sub>2</sub>O) a través de la mucosa del retículo-rumen (Asplund, 1994). Además, el



rumiante utiliza la proteína no degradada en el rumen y la formada por los propios microorganismos que llegan a tramos posteriores del tracto digestivo para cubrir sus necesidades.

Las redes tróficas del rumen están integradas por bacterias (más de 200 especies, con una concentración media de  $10^{10}$  bacterias /mL), arqueas metanogénicas, protozoos (más de 20 especies, con cifras de  $10^6$  protozoos/ mL) y hongos (cuya densidad alcanza las  $10^4$  zoosporas/ mL) (Mackie *et al.*, 2002). Las interrelaciones entre y dentro de los distintos grupos contribuyen a su estabilidad y adaptación ante eventuales cambios ambientales o alimentarios. Resulta muy complicado estudiar estas interacciones directamente en el rumen, por lo que el conocimiento que existe hasta el momento proviene casi en su totalidad de cultivos *in vitro*, puros o mixtos, en los que pueden determinarse factores de crecimiento, sustratos utilizados, rutas metabólicas implicadas o productos finales de la fermentación. En ocasiones, el cultivo *in vitro* de algunas especies bacterianas produce compuestos finales que no se encuentran en el medio ruminal en concentración apreciable; esta aparente contradicción es el resultado de la rápida utilización de estos compuestos como sustratos fermentables por otros microorganismos en el medio ruminal.

En el rumen se establecen relaciones beneficiosas, negativas y competitivas (Prins, 1977; Czerkawski, 1986). Es un sistema que fluye, en el cual los diferentes grupos, especies e individuos están interrelacionados entre sí y con su medio. El hecho de que ocupen nichos diferentes o posean diferentes estrategias de utilización de los recursos hace posible la conservación de la diversidad de las comunidades (Czerkawski, 1986). Existe una considerable interdependencia nutricional entre las comunidades microbianas del rumen, debido a que algunas especies no pueden degradar los componentes del alimento, y se apoyan en otras especies que liberan sustratos más simples (Czerkawski, 1986). Muchas bacterias utilizan para su crecimiento los productos de desecho que resultan del metabolismo de otras.

Algunos protozoos crecen y se reproducen mejor cuando se asocian con arqueas metanogénicas (Vogels *et al.*, 1980; Krumholz *et al.*, 1983; Finlay *et al.*, 1994; Tokura *et al.*, 1997), y algunos metanógenos se adhieren a protozoos entodiniomorfos cuando el  $H_2$  es limitante (Van Soest, 1994). Además, los protozoos no pueden sintetizar la vitamina B12, pero la requieren, y las bacterias que fagocitan sí sintetizan esta vitamina. También hay evidencias de que algunos hongos se asocian con arqueas metanogénicas (Bauchop y Mountford, 1981). Se han observado también interacciones, tanto positivas

como negativas, entre bacterias y hongos, dado que ciertas sustancias producidas por las bacterias afectan positiva o negativamente a la degradación de la fibra por parte de los hongos.

En algunos casos se dan relaciones de simbiosis, fenómeno que ocurre cuando dos o más microorganismos combinan sus capacidades metabólicas para degradar una sustancia que no puede ser catabolizada en forma individual por ninguno de los dos.

Dos animales comiendo exactamente lo mismo pueden desarrollar espontáneamente diferentes patrones de fermentación y diferentes comunidades microbianas (Ishaque *et al.*, 1971). Esto demuestra que las interrelaciones en cada ecosistema son importantes, y siempre hay que tenerlas en cuenta a la hora de afrontar el estudio del rumen.

Atendiendo al proceso de degradación de polisacáridos y a su posición en la cadena de degradación del alimento, los microorganismos implicados pueden clasificarse en hidrolíticos, fermentativos y utilizadores de hidrógeno (Doré y Gouet, 1991). El primer ataque al alimento lo llevan a cabo los microorganismos hidrolíticos (celulolíticos y amilolíticos, fundamentalmente), que han desarrollado diferentes mecanismos de adhesión (Bhat *et al.*, 1990). Como resultado de la hidrólisis de los polisacáridos complejos, se liberan oligosacáridos y azúcares que serán utilizados por otros grupos (Schefeinger y Wolin, 1973). Como en cualquier otro ecosistema, existe competencia entre las especies por los sustratos que necesitan. El éxito de cada una dependerá del ritmo de transporte de dichos sustratos al interior celular y de su ritmo de fermentación, que determinará la energía disponible para ellas (Wolin y Miller, 1987). El siguiente paso en la cadena es la fermentación de oligosacáridos y azúcares simples que liberará al medio VFA, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Posteriormente, las arqueas metanogénicas utilizarán el CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub> libre para formar CH<sub>4</sub>.

Si las condiciones son las adecuadas, los microorganismos del rumen crecen y se desarrollan. En el rumen existe un flujo constante de contenido (fundamentalmente líquido) hacia el abomaso, y aunque teóricamente el ritmo de división celular debería ser mayor que el ritmo de flujo de los líquidos para asegurar su supervivencia, el medio ambiente en el rumen permite gran variedad de ritmos de crecimiento, ya que muchos microorganismos, tanto bacterias como protozoos, se encuentran adheridos a las partículas de alimento (Ørskov, 1988) o retenidos en la capa sólida del rumen. Estos microorganismos no contribuyen directamente a la nutrición del hospedador, pero juegan un papel muy importante en la degradación de los alimentos fibrosos (Czerkawski, 1986). Van Glyswik *et al.* (1992) apuntaron que los microorganismos del

rumen que aparecen en número significativo tienen tasas de crecimiento suficientemente elevadas como para contrarrestar el constante ritmo de dilución del contenido ruminal, teniendo así una ventaja competitiva en el sentido de que son capaces de ocupar rápidamente los nichos ambientales disponibles.

#### 2.1.5.1. Dónde están los microorganismos dentro del rumen

Las comunidades microbianas se distribuyen espacialmente de forma heterogénea en el rumen. Algunos autores (Cheng y Costerton, 1980) diferencian tres tipos de comunidades en función de su distribución: microorganismos o bacterias asociados a la fase sólida (SAB) que están adheridas a las partículas de la digesta, microorganismos o bacterias asociados a la fase líquida (LAB), que se encuentran libres o en suspensión, y las comunidades asociadas al epitelio del retículo-rumen. Czerkawsky y Cheng (1988) diferencian también a aquellas SAB que están fuertemente adheridas, que sólo se liberan para colonizar otro sustrato durante los procesos de rumia, y aquellas de unión más lábil, que se eliminarían de la fase sólida simplemente por lavado, aunque a efectos de los trabajos de esta Memoria de Tesis Doctoral, las fuertemente adheridas se considerarán parte de las SAB, mientras que las débilmente adheridos que pasan a la fase líquida se considerarán parte de las LAB.

Entre las LAB son características *Bacteroides* sp., *Streptococcus* sp. y *Megasphaera* sp., caracterizadas por una alta velocidad de división celular que permite su mantenimiento en un medio con elevadas tasas de renovación (Czerkawsky y Cheng, 1988). Según Czerkawski y Breckenridge (1982), expresado en términos de MS, constituyen un 10% del total de microorganismos del rumen, aunque esta proporción varía en función de la disponibilidad de sustratos solubles. Alcanzan concentraciones importantes pocas horas después de la administración del alimento, disminuyendo rápidamente tras este intervalo (Kennedy y Murphy, 1988), aunque otros autores no han podido detectar diferencias significativas tras diez horas post-ingestión (Leedle, 1982).

Hace años, existía la creencia de que la mayor parte de los microorganismos se encontraba en el líquido ruminal, porque los estudios se realizaban mayoritariamente con fluido ruminal filtrado, en el cual se perdían las SAB. Posteriormente, se ha visto que la mayor parte de las bacterias del rumen se asocian a las partículas de alimento. Forsberg y Lam (1977) demostraron que el 77% del ácido diaminopimélico (DAPA), un componente de la pared celular bacteriana que se utiliza como marcador, se encontraba en la porción sólida del contenido ruminal. Las SAB pueden constituir más del 70-75%

del flujo microbiano que abandona el rumen (Legay-Carmier and Bauchart, 1989; Yang *et al.*, 2001; Ipharraguerre *et al.*, 2007).

Por lo tanto, las SAB constituyen la comunidad microbiana cuantitativamente más importante, y también la que desarrolla una mayor actividad fibrolítica, pues entre ellas existe un gran porcentaje de microorganismos celulolíticos. Se encuentran íntimamente asociados con el sustrato que utilizan, y sólo abandonan el rumen cuando las partículas de alimento a las que están adheridas alcanzan una reducción suficiente en su tamaño. Poseen tiempos de generación largos, relacionados con un ritmo de dilución mucho más lento que el de las LAB (Czerkawsky, 1986). Ejemplos característicos en este grupo son *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Borrelia* sp.

Factores como cambios en la alimentación, en la tasa de dilución del rumen, etc., provocarán cambios en la relación entre SAB y LAB. Incrementos en el ritmo de dilución de la fase líquida o en la proporción de forraje en la dieta, aumentarán la proporción de SAB; por el contrario, incrementos en la proporción de concentrados disminuirán la importancia relativa de dichas comunidades. (Czerkawsky, 1996a; Faichney, 1980; Craig *et al.*, 1987a; Faichney y White, 1988).

Las bacterias adheridas al epitelio ruminal, o flora epimural, se desarrollan en un hábitat muy diferente al resto de los microorganismos del rumen (Ørskov, 1982). El tejido del epitelio pseudoestratificado ruminal está bien irrigado y oxigenado, por lo que los microorganismos que viven asociados a su superficie son anaerobios facultativos, pueden utilizar el O<sub>2</sub>, y de hecho lo utilizan (Czerkawski, 1986; Czerkawski y Cheng, 1988; Van Soest, 1994). Muchos poseen una actividad ureasa intensa (que no aparece en el epitelio ruminal) que interviene en el reciclaje de la urea plasmática (Cheng y Wallace, 1979). Estas bacterias utilizan como sustrato de crecimiento las células epiteliales de descamación, y su importancia relativa, aunque varía según los autores, puede llegar al 15% (Czerkawski, 1986). Cheng *et al.* (1979) y Czerkawski (1986) han señalado que suponen un contaminante del líquido ruminal más que un constituyente de la flora funcional. Especies epimurales características son *Fusobacterium* sp. y algunos cocos gram positivos.

#### 2.1.5.2. Bacterias

La mayor parte de las bacterias del rumen son anaerobias estrictas, aunque como se ha visto, las que están adheridas a la pared ruminal acceden al oxígeno plasmático y utilizan el O<sub>2</sub> que entra en el rumen. Las bacterias componen el 50-60% de la masa

microbiana del rumen (Stewart *et al.*, 1997) y de todos los grupos microbianos que viven en él son las que poseen el mayor ritmo de generación y la menor tasa de retención, constituyendo por ello la principal fuente de N para el rumiante cuando llegan al duodeno.

Hay diferentes formas de clasificar las bacterias del rumen. Una de las más extendidas se basa en el principal sustrato que utilizan (Yokohama y Johnson, 1988).

Los forrajes fibrosos son degradados por las bacterias celulolíticas. Su actividad viene dada por un complejo enzimático extracelular con funciones específicas para la degradación escalonada de la celulosa, rompiendo los enlaces beta 1-4, hasta glucosa (Yokohama y Johnson, 1988). Son anaerobias estrictas, y su rango óptimo de pH se sitúa entre 6,8 y 6,2. Cuando el pH desciende de este último valor, su crecimiento se ve severamente afectado (Stewart, 1977; Hoover, 1986). Algunos autores proponen que las bacterias que fermentan carbohidratos complejos utilizan  $\text{NH}_3$ , mientras que aquellas que fermentan azúcares sencillos utilizan preferentemente proteína preformada (Russell *et al.*, 1992). Su ritmo de crecimiento depende también de la disponibilidad de ácidos grasos de cadena ramificada, siendo en general un grupo de crecimiento lento (tasa de renovación de unas 18 horas). Como es lógico, predominan en el rumen cuando el animal recibe dietas ricas en forrajes, mientras que su número tiende a disminuir al aumentar la disponibilidad de carbohidratos solubles. De los tres VFA principales producen fundamentalmente acético, y en menor medida propiónico y butírico.

La hemicelulosa y las pectinas también son degradadas gracias a enzimas extracelulares producidas por algunas bacterias celulolíticas, o por otros grupos que utilizan específicamente estos sustratos (Van Soest, 1994).

El almidón es degradado por las bacterias amilolíticas, mediante la intervención de alfa amilasas extracelulares que rompen al azar los enlaces alfa 1-4 de las cadenas (Yokohama y Johnson, 1988). Tienen un índice metabólico rápido, con una tasa de duplicación mucho más reducida (de 15 min a 4 horas) que las celulolíticas. Sintetizan proteínas a partir de aminoácidos y  $\text{NH}_3$ . Son menos sensibles al pH ruminal (Hoover, 1986) con un valor óptimo para el crecimiento más bajo, de 5,5 a 6,6. Predominan en el rumen de aquellos animales alimentados con dietas que tienen una elevada proporción de carbohidratos solubles, aunque algunas especies también degradan la celulosa. Muchas bacterias amilolíticas pueden fermentar también los azúcares sencillos y carbohidratos de bajo peso molecular liberados durante el proceso de hidrólisis de otros

más complejos como el almidón o la celulosa, aunque en este caso no se adhieren a las partículas. Producen mayor cantidad de ácido propiónico que las celulolíticas.

La mayor parte de las bacterias que degradan los carbohidratos complejos pueden degradar también azúcares simples (Hungate, 1966), aunque existen especies con una actividad degradativa específica para un determinado sustrato. Algunas bacterias utilizan los ácidos orgánicos (láctico, succínico, fórmico) resultantes de la fermentación llevada a cabo por otras bacterias (Wolin *et al.*, 1997). El láctico puede ser degradado hasta acético o propiónico, el succínico convertido en propiónico y CO<sub>2</sub>, y el fórmico utilizado como precursor en la formación de CH<sub>4</sub>. Así, se eliminan del medio ruminal algunos productos que, de acumularse en exceso, podrían inhibir la fermentación (Ørskov y Ryle, 1990).

La proteína del alimento se degrada mediante enzimas secretadas al medio por las bacterias con actividad proteolítica. En el proceso de degradación de la cadena polipeptídica intervienen diversas especies en cada uno de los pasos. En la proteólisis se produce la ruptura de las proteínas. Los péptidos entran al interior de las bacterias, donde por procesos de peptidólisis son desdoblados en aminoácidos, que formarán parte posteriormente de la proteína microbiana, o bien son desaminados para dar VFA, NH<sub>3</sub> y ácidos carboxílicos (Stewart *et al.*, 1997). Los VFA producidos durante la fermentación de las proteínas son el isobutírico, el isovalérico y el 2-metilbutírico.

Las bacterias pueden formar directamente aminoácidos a partir de N no proteico (como el NH<sub>3</sub>, los nitratos y la urea) y VFA. La urea es degradada por las bacterias ureolíticas que, como se ha visto, forman parte importante de la flora epimural.

#### 2.1.5.3. Arqueas metanogénicas

Los metanógenos son un grupo de microorganismos procariotas que tradicionalmente se clasificaban taxonómicamente dentro de las bacterias, pero que en la actualidad han sido incluidas en el dominio de las arqueas. Son anaerobias estrictas, y producen CH<sub>4</sub> a partir de la reacción del CO<sub>2</sub> con H<sub>2</sub> gaseoso. Al reducir la concentración de H<sub>2</sub> en el rumen, regeneran el poder reductor de cofactores como el NAD<sup>+</sup> y el FAD<sup>+</sup>, promoviendo el crecimiento de otras especies. Cuando el animal come alimento muy molido o en forma de *pellets*, o bien cuando la proporción de carbohidratos rápidamente degradables es alta en la dieta, las arqueas metanogénicas ven reducido su crecimiento y se produce un descenso en la producción de CH<sub>4</sub>, que puede llevar a una acumulación de H<sub>2</sub> que inhibirá el desarrollo de las comunidades

productoras de H<sub>2</sub> y de acético, y estimulará el uso del H<sub>2</sub> por parte de las que producen propiónico, disminuyendo la relación Ac:Pr (Hobson y Wallace, 1982). Existen bacterias que son capaces de generar CH<sub>4</sub> mediante otras rutas, por ejemplo a partir de metanol, metilamina y acético (Yokohama y Johnson, 1988).

#### 2.1.5.4. Protozoos

Pese a que el número de protozoos en el rumen es menor que el de las bacterias (en torno a 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>/ mL), su tamaño es mucho mayor que el de estas (entre 15 y 200 micras) y según algunos autores (Orpin, 1984; Jouany, 1996) pueden representar hasta el 40% del N microbiano total, y proporcionar el 60% de los productos de fermentación microbiana, siendo responsables del 25% de la actividad celulolítica en el rumen. Los protozoos ruminales son anaerobios estrictos y pertenecen a varios grupos que comúnmente han sido divididos en dos: holotricos y entodiniomorfos. Los holotricos tienen la superficie del cuerpo cubierta de cilios y su forma es ovalada o redondeada; son móviles y utilizan carbohidratos no estructurales, fundamentalmente solubles. Los entodiniomorfos son más complejos en cuanto a su morfología, y también más específicos en sus requerimientos nutritivos. Pueden utilizar almidón (almacenándolo en ocasiones en forma de vacuolas), celulosa, hemicelulosa, pectina y azúcares solubles, dependiendo de los grupos (Van Soest, 1994), produciendo VFA y H<sub>2</sub>, que será utilizado por las arqueas metanogénicas adheridas a su superficie para producir CH<sub>4</sub> (Van Soest, 1994). También depredan bacterias e incluso otros protozoos; esto unido a su secuestro en la masa sólida de la digesta, hace que disminuyan la eficiencia de síntesis microbiana (EMS) en el rumen y provoquen un reciclado de N entre las mezclas bacteriana, protozoaria y de N amoniacal (Viera, 1986; Koenig *et al.*, 2000).

Los procesos de fagocitosis hacen difícil diferenciar su actividad enzimática de la de los organismos que han fagocitado, y la actividad celulolítica de los protozoos puede estar mediada por las bacterias presentes en su interior. Poseen una fuerte capacidad proteolítica, produciendo grandes cantidades de NH<sub>3</sub>, aunque no tienen actividad ureasa ni pueden sintetizar aminoácidos a partir de compuestos nitrogenados simples (Jouany y Ushida, 1998), por lo que hacen uso de la proteína del alimento que ingieren o de la de las bacterias (Viera, 1986; Williams, 1986; Williams y Coleman, 1988) constituyendo el N de origen bacteriano hasta el 72% de la fracción de N protozoario (Olobobokun *et al.*, 1988).

La proporción de N protozoario que alcanza el duodeno es menor que la de N bacteriano, ya que los protozoos presentan un mayor tiempo de retención en el rumen

que las bacterias (Jouany y Ushida, 1998). Los protozoos contribuyen a la degradación ruminal de la fibra, y su presencia estimula la actividad celulolítica de las bacterias (Demeyer, 1981; Orpin, 1984) y reduce la amilolítica (Mendoza *et al.*, 1993). Los protozoos ayudan a conseguir una pauta de fermentación más estable, reduciendo el número de bacterias y su actividad a través de la predación y la competición por el sustrato (Nagaraja *et al.*, 1992). La habilidad de los protozoos para fagocitar y almacenar almidón y azúcares solubles evita su rápida degradación, pues el sustrato dentro de la célula protozoaria fermenta lentamente, y protege de eventuales descensos bruscos en el pH ruminal cuando el animal consume elevados niveles de alimentos concentrados (Williams y Coleman, 1986; Yokohama y Johnson, 1988; Mendoza *et al.*, 1993). Aun así, cuando el rumiante ingiere dietas con un nivel muy elevado de carbohidratos no estructurales, el número de protozoos en el rumen disminuye en gran medida. Este descenso se atribuye a que cuando ingieren cantidades excesivas de almidón o carbohidratos solubles sufren un proceso de lisis, y también al descenso del pH provocado por este tipo de dietas, pues son muy sensibles al pH y si este disminuye por debajo de 5,5 pueden llegar a desaparecer del rumen (Franzolin y Dehority, 1996). En cualquier caso, la sensibilidad de los protozoos a los factores ambientales varía dependiendo de los grupos (Franzolin y Dehority, 1996). Por ejemplo, las especies del género *Entodinium* toleran bajos pH y poseen ritmos de crecimiento rápidos, y suelen ser las predominantes cuando el animal consume dietas muy concentradas (Van Soest, 1994).

En los tramos postgástricos no se establecen comunidades protozoarias; esto puede deberse al bajo pH del abomaso, que los elimina del sistema (Hobson, 1971).

Aún no está claro si los protozoos proporcionan algún beneficio o ventaja a los rumiantes pero, como apuntó Czerkawski (1986), no existen análogos a ellos en ningún ecosistema externo al rumen, lo que indica que han sufrido un proceso evolutivo conjunto con el resto de microorganismos del sistema ruminal, conservándose, y esto debe hacer pensar que cumplen alguna función. Sin embargo, los animales defaunados pueden sobrevivir, y los procesos de fermentación continúan sin su presencia, aunque la información al respecto resulta contradictoria. La defaunación tiende a decrecer las pérdidas de energía en forma de CH<sub>4</sub>. Cuando los protozoos son eliminados o inhibidos, el número de bacterias suele aumentar. Además, debido al proceso de secuestro de los protozoos en el entramado sólido de la digesta, se produce un fenómeno de retención de la proteína microbiana en el rumen. Por ello, puede suponerse que en los animales



defaunados la producción de proteína microbiana será mayor, y se incrementará el flujo de proteína microbiana al abomaso (Dehority, 2003). Veira (1986) y Williams y Coleman (1997) sugirieron que el efecto de la defaunación depende de la dieta y del balance entre energía y N.

Algunos grupos de protozoos pueden presentar largos tiempos de generación que van de 29 h (Dehority, 2004) a dos o tres días (Sylvester *et al.*, 2009), aunque el tiempo medio de división es de 24 h (Harrison y McAllan, 1980). Sin embargo, con la mayoría de las dietas, el tiempo medio de retención de la fase líquida es considerablemente inferior a las 24 h y frecuentemente menor de 10 h. Por ello, el elevado tiempo de retención de los protozoos, secuestrados en la fase sólida del rumen, es una condición indispensable para su supervivencia, dado que si lo abandonaran a la misma velocidad que el líquido ruminal, no les daría tiempo a reproducirse.

Cuando los protozoos son degradados en el intestino, aportan al rumiante proteínas de excelente calidad, partículas de almidón no digeridas y ácidos grasos poliinsaturados como el linoleico.

#### 2.1.5.5 Hongos

La presencia de hongos anaerobios de la clase Chytridiomycetes en el sistema digestivo de los rumiantes fue identificada hace unas décadas (Orpin, 1977), cuando algunos de los que se consideraba que eran protozoos flagelados se reclasificaron como zoosporas fúngicas móviles. Su densidad se ha calculado en unas  $10^4$  zoosporas/mL (Mackie *et al.*, 2004), y Orpin (1984) estimó en más de un 8% su contribución a la biomasa microbiana ruminal. Tienen un largo tiempo de generación, y aseguran su supervivencia adhiriéndose a partículas de alimento de gran tamaño (Orpin y Joblin, 1997). La mayoría de los hongos pueden fermentar el almidón y el glucógeno, aunque utilizan preferentemente azúcares simples (Gordon y Phillips, 1998). También son capaces de digerir y utilizar celulosa y hemicelulosa. Son anaerobios, y colonizan los tejidos lignocelulósicos de las plantas participando en la degradación de la fibra (Orpin y Joblin, 1987), introduciendo sus filamentos rizoidales en el tejido vegetal y liberando un complejo enzimático celulolítico que rompe los enlaces del alimento fibroso. De esta manera, facilitan también el acceso de aquellas bacterias que atacan las fibras en los puntos de ruptura. Durante el proceso de degradación del alimento, los hongos liberan al medio VFA, gases y trazas de etanol y ácido láctico. Las mayores concentraciones de hongos están en el rumen, aunque su número también es elevado en el intestino grueso (Davies *et al.*, 1993). Debido a que los hongos tienen un efecto considerable en la

actividad fibrolítica ruminal, su eliminación causa un descenso en la degradación del alimento, y consecuentemente, una reducción en la ingesta, especialmente de aquellos alimentos con menor calidad nutritiva (Gordon y Phillips, 1993).

Existen discrepancias en cuanto a los factores que afectan a las comunidades fúngicas del rumen. Algunos autores señalan que a mayor contenido de fibra en la dieta, mayor número de hongos habrá en el rumen (Grenet *et al.*, 1989) mientras que otros (McAllister y Cheng, 1996) apuntan que este grupo de microorganismos no se ve afectado por el tipo de dieta ni por el pH ruminal.

#### **2.1.6. Qué comen los rumiantes y qué ocurre cuando comen. Metabolismo ruminal.**

El alimento de los rumiantes, como el del resto de los animales, está constituido principalmente por hidratos de carbono, proteínas y lípidos. En el rumen el alimento fermenta y, como se ha visto, se transforma en productos finales y en masa microbiana. Algunos de los productos son absorbidos a través de la pared del rumen y metabolizados por el animal, mientras que el alimento no fermentado pasa al abomaso y al intestino junto con el resto de productos de fermentación no absorbidos y parte de la masa microbiana formada, donde se digieren antes de su absorción.

Los rumiantes, de forma natural (salvaje o ganadería extensiva), consumen alimentos de origen vegetal, que se caracterizan por tener una proporción importante de hidratos de carbono (entre el 50 y el 80% de la MS según Van Soest (1994)). Los carbohidratos de las plantas se clasifican en dos grupos en función de si forman parte o no de la pared celular vegetal: estructurales y no estructurales (Bailey, 1973; Smith, 1973). Los primeros engloban a la celulosa, la hemicelulosa, las pectinas y los beta-glucanos. La celulosa y hemicelulosa pueden formar enlaces covalentes con la lignina (un polímero fenólico que aparece en las plantas maduras) (Akin y Benner, 1988; Liyama *et al.*, 1994) y tienen un ritmo de degradación lento. Las pectinas y los beta-glucanos no se asocian con la lignina, son parcialmente solubles en agua y su degradación es más rápida; por ello en ocasiones son incluidos en el grupo de los hidratos de carbono no estructurales.

Este grupo, por su parte, engloba a los carbohidratos de reserva como el almidón, los galactanos y las fructosanas, oligosacáridos como la maltosa o la sacarosa y monosacáridos como la fructosa y la glucosa (Nocek y Tamminga, 1991).

La celulosa, la hemicelulosa y las pectinas son degradadas mediante enzimas (celulasas, hemicelulasas y pectinasas) producidas por las bacterias que rompen los enlaces beta 1-4, mientras que la lignina no es degradada por las enzimas bacterianas ni por las del rumiante, y se elimina, sin ser digerida, en las heces, y además protege a otros carbohidratos de los procesos digestivos (Susmel y Stefanon, 1993; Van Soest, 1994). Los carbohidratos no estructurales son degradados por las bacterias que poseen las enzimas necesarias para romper los enlaces alfa 1-4.

Cuando el material vegetal es atacado por las enzimas bacterianas se liberan monosacáridos y oligosacáridos, que son utilizados de nuevo por los microorganismos para la formación de piruvato por la vía metabólica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). En aerobiosis, el piruvato entraría en el Ciclo de Krebs, y por un proceso de fosforilación oxidativa se obtendría energía en forma de ATP, formándose también CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Sin embargo, en condiciones de anaerobiosis como las existentes en el medio ruminal, a partir del piruvato se obtienen VFA y gases, por diferentes vías metabólicas (France y Siddons, 1993; Van Houtert, 1993). En aerobiosis, 1 mol de glucosa rinde 38 moles de ATP, mientras que en anaerobiosis sólo se obtienen 5 moles de ATP. Como dice Czerkawski (1986), la vida sin oxígeno no es fácil.

La síntesis de los ácidos grasos de cadena larga (componentes principales de los fosfolípidos y triglicéridos) y la biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados son, sin embargo, un proceso “barato” en las condiciones del rumen debido a la elevada presencia de cofactores reducidos en el medio. Lo mismo ocurre con la síntesis proteica.

Los VFA (acético, propiónico, butírico, y, en menor medida, valérico, caproico, isobutírico, isovalérico y 2-metilbutírico) constituyen la principal fuente de energía para el rumiante (France y Siddons, 1993). Todos ellos son ácidos débiles, y se absorben por difusión pasiva en forma no disociada a través de la pared ruminal, aunque algunos estudios *in vitro* indican que pueden existir también transportadores aniónicos no específicos (Rechkemmer *et al.*, 1995; Gäbel y Sehested, 1997). La velocidad de absorción dependerá del pH del medio y del tipo de ácido graso. El pH ácido favorece la forma no disociada, y a mayor longitud de cadena mayor velocidad de absorción. Así, el ácido valérico (5 átomos de carbono), se absorberá mejor que el butírico (4 átomos de carbono), propiónico (3 átomos de carbono) y acético (2 átomos de carbono). Una parte muy importante de los VFA no llega al torrente sanguíneo porque es metabolizada en el epitelio del rumen. El propiónico es convertido en pirúvico y láctico, el butírico en beta-

hidroxibutírico y el acético se transforma, aunque en menor medida, en cuerpos cetónicos y  $\text{CO}_2$  (Van Houtert, 1993).

Los monosacáridos procedentes de la degradación de los carbohidratos son transformados en piruvato mediante la vía EMP, y posteriormente el piruvato es transformado en VFA mediante diferentes rutas metabólicas (Van Soest, 1994). Los ácidos acético y butírico tienen como intermediario el Acetil CoA, mientras que el propiónico se genera vía succinato y, en menor medida, acrilato (Murphy *et al.*, 1982; Van Houtert, 1993). En la producción de acético y butírico se genera poder reductor, mientras que en la producción de propiónico se utiliza. Sin embargo, la mayor proporción es usada por las metanogénicas para convertir el  $\text{CO}_2$  en  $\text{CH}_4$  en un proceso que gasta 32 kcal/mol, utilizando esta energía para su propio crecimiento y “robándosela” al rumiante (Czerkawski, 1986).

Las proteínas y los lípidos también pueden fermentarse hasta VFA (France y Siddons, 1993). La fermentación de los esqueletos carbonados liberados tras la desaminación de los aminoácidos produce principalmente isobutírico, isovalérico y 2-metilbutírico (Cotta y Hespell, 1986), en mayor o menor medida dependiendo de la dieta. Sólo el glicerol y la galactosa, que se liberan tras el catabolismo lipídico, son fermentados, y por ello los lípidos producen una cantidad pequeña de VFA.

El patrón de producción de los VFA en el rumen está determinado por las comunidades microbianas presentes en él, que como se ha visto, dependen a su vez de la dieta. Cuando esta es rica en hidratos de carbono cuya degradación hasta piruvato es lenta, se mantiene una relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  elevada que favorece el desarrollo de las bacterias acetogénicas (Van Houtert, 1993). Cuando la dieta es rica en carbohidratos de degradación rápida, se produce un incremento en la producción de ácido propiónico. Otros factores, como el nivel de ingestión, la frecuencia de alimentación, el procesado del alimento, los aditivos, etc., pueden afectar al patrón de producción de los VFA (Thomas y Rook, 1981; Ørskov, 1981; Van Nevel y Demeyer, 1988).

El N que entra en el rumen con el alimento procede tanto de las proteínas como de los compuestos nitrogenados no proteicos (ácidos nucleicos, nitratos, nitritos,  $\text{NH}_3$ , urea, etc). También existe una importante fuente en forma de N endógeno, que procede de las enzimas de la saliva y de la descamación del epitelio digestivo, y del reciclado de la urea plasmática a través de la saliva o por difusión a través de las paredes del rumen. Todos estos compuestos son degradados por las enzimas de los microorganismos hasta compuestos más simples, que serán utilizados por estos para formar sus propias

estructuras, o continuarán el proceso de fermentación. En principio, esta degradación podría parecer un proceso ineficiente (al fin y al cabo, ¿para qué romper y volver a formar la proteína que entra con el alimento?), pero gran parte de las proteínas vegetales no pueden ser aprovechadas por el rumiante, y además carecen en muchos casos de los aminoácidos esenciales (Czerkawski, 1986).

Las proteínas del alimento son degradadas en su mayor parte por los microorganismos en el rumen, formando proteína microbiana que, a su vez, será degradada en el intestino del animal. Aproximadamente dos tercios de los aminoácidos absorbidos por un rumiante son de origen microbiano, siendo la masa microbiana la mejor fuente proteica para cubrir sus necesidades (Verbic, 2002). Es por ello que la alimentación de los rumiantes debe controlarse cuidadosamente para optimizar la cantidad de proteína microbiana que llega al intestino. Si la relación entre el aporte proteico y de energía en la dieta está en equilibrio, se produce el máximo crecimiento de los microorganismos, además de cantidades equilibradas de VFA, gases ( $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ ) y  $\text{NH}_3$ . Si el aporte de energía en relación con el aporte de proteína es muy elevado, por ejemplo cuando hay un exceso de carbohidratos en la dieta, el crecimiento microbiano se verá reducido, ya que los microorganismos no pueden formar suficiente proteína, y desperdiciarán energía (Russell y Strobel, 1993, Van Kessel y Russell, 1996), porque un exceso de ATP puede resultar tóxico para ellos y tienen que adoptar estrategias para producir menos ATP a partir de la fermentación de los carbohidratos (Russell, 1998). Esto redundará en un aumento de la producción de ácido láctico y propiónico en relación al acético. La producción total de ácidos grasos aumentará en gran medida, produciendo una acidificación del medio que irá acompañada de una mayor producción de gases ( $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ ) y una reducción de la producción de  $\text{NH}_3$ . Por el contrario, si la dieta es muy rica en proteínas, el crecimiento microbiano estará limitado porque los microorganismos, al tener un déficit de energía, se verán obligados a degradar el excedente proteico para obtenerla. Así, aparecerán altas concentraciones de  $\text{NH}_3$  en el medio, y se formará una gran cantidad de urea en el hígado que va a ser eliminada en la orina, con lo que el proceso no es eficiente. Una forma de proporcionar al rumiante proteínas de alta calidad evitando que sean degradadas en el rumen es la modificación de estas mediante diferentes tratamientos que las protegen del ataque microbiano (las denominadas proteínas by-pass), de manera que pasan hasta el intestino prácticamente intactas, para ser allí degradadas por las enzimas pancreáticas.

El ritmo de degradación de la proteína en el rumen está afectado por las características inherentes a las proteínas y por la actividad proteolítica de los microorganismos (Wallace, 1996). Además, también influyen factores como la dieta, el régimen de alimentación, la relación forraje:concentrado, el procesado y presentación del alimento, etc. Estos factores pueden provocar cambios en las condiciones del rumen que a su vez pueden alterar la actividad proteolítica (Schadt *et al.*, 1999). Además, también influyen en la calidad de la proteína alimentaria no degradada en el rumen que fluye al duodeno (Stern *et al.*, 1994).

Los lípidos representan un bajo porcentaje en la composición de los alimentos forrajeros (del 3 al 5% de la materia seca), pero son muy importantes en las semillas oleaginosas que en ocasiones se utilizan en las dietas de los rumiantes (soja, girasol, etc.). Los microorganismos, mediante lipasas extracelulares, hidrolizan hasta el 95% de los triglicéridos y fosfolípidos, de tal forma que los ácidos grasos que los componen, así como algunos productos como glicerol o galactosa quedan libres en el medio ruminal (Harfoot y Hazlewood, 1997). Los ácidos grasos insaturados libres sufren un proceso de biohidrogenación, adquiriendo diferentes niveles de saturación, mientras que el glicerol, galactosa, etc., son fermentados hasta VFA, principalmente propiónico y butírico. Debido a la anaerobiosis reinante en el rumen, los ácidos grasos libres no pueden ser utilizados como fuente de energía por las bacterias, aunque se ha descrito su degradación parcial hasta cuerpos cetónicos en el epitelio ruminal, donde probablemente son oxidados por la comunidad anaerobia facultativa (Tamminga y Doreau, 1991).

Al igual que en el caso de las proteínas, existen métodos para proteger las grasas del ataque de los microorganismos ruminales y conseguir que lleguen intactas al intestino (grasa by-pass).

#### **2.1.7. Estimando el crecimiento microbiano**

Normalmente, la síntesis de proteína microbiana se estima en función del aporte de energía de la dieta, dado que este es el principal factor limitante para el crecimiento microbiano. Hay muchos factores que afectan a la eficiencia de síntesis microbiana, entre ellos la fuente de hidratos de carbono y de N, el ritmo de paso de la digesta ruminal, el nivel de ingestión, la frecuencia de alimentación, los métodos de conservación o procesado de los alimentos, las condiciones ambientales, la suplementación mineral, los aditivos, etc. (Hoover, 1986; Sniffen y Robinson, 1987;

Clark *et al.*, 1992; Stern *et al.*, 1994; Broudiscou y Jouany, 1995; Firkins, 1996; Firkins *et al.*, 1998; Weimer, 1998; Dewhurst *et al.*, 2000).

La cuantificación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen y la determinación de la degradabilidad de la proteína de los alimentos son dos puntos críticos en los sistemas de valoración proteica para rumiantes (Clark *et al.*, 1992). En los estudios *in vivo* es necesario recoger la digesta duodenal mediante cánulas reentrantes, o bien tomar muestras puntuales a través de cánulas simples y estimar el flujo mediante marcadores. En los estudios *in vitro*, la determinación de la síntesis de proteína microbiana se simplifica, porque se puede calcular la digesta total sin usar marcadores de flujo, y además no existe la fracción de N endógeno. Mediante el uso de marcadores microbianos se diferencia el N microbiano del alimenticio (y el endógeno, en el caso de los experimentos *in vivo*). Para ello, se toma la digesta o una muestra representativa de la misma, y se aíslan los microorganismos presentes en ella. La relación entre marcador:N de la dieta y marcador:N de los microorganismos representará la fracción de la digesta que es de origen microbiano, pudiendo conocer así cuántos microorganismos se han formado.

Existen métodos indirectos de estimación de la síntesis de proteína microbiana que no requieren la canulación de los animales. El más utilizado es el análisis de derivados púricos en orina, puesto que existe una estrecha relación entre la excreción urinaria de estos y el flujo duodenal de bases púricas de origen microbiano, por lo que se puede estimar el flujo de N microbiano al duodeno si se conoce la excreción urinaria de derivados púricos (Balcells *et al.*, 1991).

Broderick y Merchen (1992), y posteriormente Dehority (1995) propusieron siete requisitos que deberían ser cumplidos por un marcador microbiano ideal: 1) ser fácil de determinar y cuantificar; 2) no formar parte de los alimentos que reciben los animales; 3) distribuirse de forma homogénea entre los microorganismos ruminales; 4) ser biológicamente estable; 5) no ser absorbido en el tracto digestivo; 6) estar en proporción constante en los microorganismos ruminales en todas las fases de su crecimiento, y 7) que todas sus formas presenten el mismo ritmo de tránsito a través del tracto digestivo.

Ninguno de los marcadores que se han utilizado hasta ahora cumple a la perfección todos estos requisitos, con lo que la elección de un marcador para realizar estudios de síntesis de proteína microbiana es un punto delicado a la hora de plantear un experimento (Carro, 2001).

Los marcadores pueden ser externos (se añaden al medio ruminal o al medio de cultivo de forma exógena para que los microorganismos los incorporen), entre los que destacan el  $^{15}\text{N}$ , el  $^{35}\text{S}$  y el  $^{32}\text{P}$ , o internos (son constituyentes específicos de las comunidades microbianas), siendo los más utilizados los ácidos nucleicos, las bases púricas, el ácido diaminopimélico (DAPA) y el ácido aminoetilfosfónico (AEPA), este último específico para protozoos.

El  $^{15}\text{N}$  es un isótopo estable que se utiliza como marcador microbiano externo. Se administra habitualmente en forma de cloruro o sulfato amónico, o en ocasiones urea (todos ellos solubles en agua). De esta forma se infunden en el rumen o en los fermentadores artificiales. Debido a que el  $\text{NH}_3$  constituye una de las principales fuentes de N para los microorganismos ruminales (Satter y Slyter, 1974), a los pocos días se logra un enriquecimiento constante de estos (Beckers *et al.*, 1995). Las ventajas del  $^{15}\text{N}$  radican en que no es radiactivo, que el enriquecimiento natural en este isótopo de los alimentos es conocido y constante, y que la precisión y exactitud de su análisis mediante espectrometría de masas es excelente, pudiéndose detectar enriquecimientos del 0,001% sobre el natural.

Pese a su idoneidad, el  $^{15}\text{N}$  también presenta inconvenientes que es necesario mencionar. Como lo que realmente se determina es la incorporación de  $\text{NH}_3$  por los microorganismos, no se tiene en cuenta la incorporación de aminoácidos y péptidos. Además, no todos los microorganismos ruminales utilizan los compuestos nitrogenados en la misma medida (Russell *et al.*, 1992); por lo tanto, es posible encontrar enriquecimientos diferentes en las distintas comunidades microbianas. En muchos experimentos realizados tanto *in vivo* (Martín *et al.*, 1994; Beckers *et al.*, 1995; Pérez *et al.*, 1997) como *in vitro* (Komisarczuk *et al.*, 1987a; Carro y Miller, 1999; Ranilla *et al.*, 2001b) se ha observado que las SAB incorporan menos  $\text{NH}_3$  que las LAB, existiendo también diferencias entre bacterias y protozoos, dada la incapacidad de estos para utilizar el  $\text{NH}_3$  como fuente de N (Steinhour *et al.*, 1982). También se han encontrado variaciones en el enriquecimiento con el tiempo post-ingestión (Martín *et al.*, 1994) relacionadas con la disponibilidad ruminal de N. Otro inconveniente es el alto precio del isótopo, que supone un problema a la hora de utilizar grandes cantidades *in vivo*, pero que en experimentos *in vitro* puede resultar asequible. La preparación de las muestras para su análisis es laboriosa, pero la precisión de los resultados compensa el esfuerzo.



Dadas las ventajas expuestas y que el  $^{15}\text{N}$  es actualmente el marcador externo más idóneo (Carro, 2001), este marcador fue el elegido para los trabajos de la presente Memoria de Tesis Doctoral.

## **2.2. Simulando la fermentación**

### **2.2.1. Reseña histórica. Primeros intentos**

El afán de conocimiento es inherente a la especie humana. La curiosidad, en muchas ocasiones unida a la necesidad, mueve al hombre a inmiscuirse en aquellos aspectos que no comprende o profundizar en los que quiere comprender mejor. El estómago de los rumiantes y todo lo que en él acontece ha supuesto, para los investigadores, un importante desafío científico desde que comenzaron a interesarse por él, y en un principio era considerado como una “caja negra” en la cual se sabía lo que entraba y lo que salía, pero no lo que acontecía en su interior (Czerkawski, 1986). El rumen 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 que además, como ecosistema que es, acoge una constante relación de acción-reacción entre los factores bióticos y abióticos y a su vez con el animal hospedador. Parece claro que aunque se tenga acceso a su interior por medios quirúrgicos, el estudio de los mencionados procesos *in vivo* puede resultar una tarea ardua, compleja de abordar y con una gran dificultad para el control estricto de todos los factores implicados, que son fuente de una importantísima variabilidad (Bryant y Robinson, 1968).

Es por ello que en el incipiente acercamiento al conocimiento del medio ruminal, algunos científicos advirtieron que quizá fuera posible emular los procesos que tienen lugar en el rumen. Durante muchos años se han hecho intentos de aislar pequeñas fracciones de su contenido y se les ha “permitido” continuar fermentando bajo condiciones controladas, *in vitro*, en el laboratorio. Los intentos por construir un rumen artificial han sido numerosos, pero históricamente, estos estudios comenzaron de forma relativamente tardía al desarrollo de otros campos, quizá porque requerían del desarrollo de las técnicas necesarias (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 papel y algodón y viendo cómo estos materiales desaparecían lentamente, con lo que concluyó que se producía una degradación de la celulosa, asociada además a la producción de VFA (principalmente acético y butírico),

CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>. En 1891, Zuntz postuló que el 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 de la flora y fauna 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 (1950) comenzaron a aislar algunas especies para profundizar en su estudio.

En 1938, Woodman y Evans estudiaron la digestión de la celulosa de forma similar a Tappeiner (1884) y concluyeron que la glucosa sólo era un intermediario en la digestión en el rumen, siendo los productos finales de la digestión los VFA 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, añadiendo además que era absolutamente necesario que se incrementara la investigación en este campo.

El sistema de Pearson y Smith (1943) consistía en un tubo de ensayo o contenedor 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 y encontraron que se producían grandes cambios en la flora ruminal tras un día de incubación. Por otra parte, ratificaron la utilización de la urea para la formación de proteína microbiana y su hidrólisis hasta NH<sub>3</sub>, 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, 1969). 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, entre otros, por Marston (1948) o 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). Prácticamente todos los estudios realizados con posterioridad a esta fecha han utilizado la saliva artificial formulada por McDougall (1948), o modificaciones de esta.

En 1949 Louw *et al.* desarrollaron un sistema en el que el alimento era introducido en bolsas hechas de material semi-permeable suspendidas en una solución mineral que se sometía a diálisis, pretendiendo así simular la absorción de productos finales en el rumen, pero no mejoraron sustancialmente los resultados obtenidos mediante los otros métodos.

### **2.2.2. Segunda etapa**

En 1956, Warner estableció tres criterios necesarios para que un sistema *in vitro* fuera válido a la hora de representar las condiciones *in vivo*: 1) que mantuviera las cantidades, apariencia y proporciones de las “bacterias, selenomonas y protozoos”; 2) que mantuviera unas tasas normales de degradación de la celulosa, el almidón y las proteínas, y la interacción normal entre ellas; y 3) que fuera capaz de predecir de forma cuantitativa los resultados obtenidos *in vivo*. A partir de este momento, numerosos autores han tratado de diseñar sistemas que satisficieran estos requerimientos, con mayor o menor éxito dependiendo de los trabajos (Warner 1956, Adler *et al.*, 1958; Davey *et al.*, 1960; Gray *et al.*, 1962; Bowie, 1962; Harbers y Tillman, 1962). Gray *et al.* (1962) diseñaron un rumen artificial complejo, con el cual encontraron que la formación de VFA a partir de un sustrato dado era exactamente paralela 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
- 5) Estudios de fenómenos que requieren un estado “no estacionario”
- 6) Técnicas de screening de sustancias
- 7) Evaluación de la digestión de los forrajes y de las diferencias bioquímicas entre especies vegetales

En 1964, Slyter *et al.* desarrollaron uno de los primeros sistemas que permitían el cultivo *in vitro* de forma continua, es decir, mantenido en el tiempo, durante unas semanas en este caso. De esta forma, era posible investigar cómo evolucionaban las comunidades microbianas con el paso de los días. Hoover *et al.* (1976a, b) intentaron simular el flujo diferencial de las partículas de diferentes tamaños en el rumen, incorporando un filtro. En un principio se diseñó el sistema para cambiar el filtro cada

24 horas, pero pronto comprobaron que era necesario cambiarlo mucho más a menudo. Czerkawski (1986) opina que no debe ser el sistema el que “decida” la velocidad de flujo de las partículas (lo cual supone una pérdida de control inevitable), y por ello en 1977 propone el uso del Rumen Simulation Technique (Rusitec) 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* que en sus diferentes versiones sirvieron para estudiar aspectos de la microbiota ruminal, 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 la evolución de las cinéticas de fermentación y de las propias comunidades microbianas. Suponen una simplificación importante del complejo proceso de fermentación ruminal y generan información que es de gran utilidad para el diseño y clarificación de los ensayos *in vivo* (Merry *et al.*, 1990).

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), reflejando que, en muchas ocasiones, la complejidad del sistema hace inviable la repetibilidad de los experimentos.

### **2.2.3. Por qué utilizar fermentadores artificiales y qué se puede hacer con ellos**

Mientras que las técnicas de producción de gas *in vitro* (IVGPT) proporcionan datos muy útiles acerca de la cinética de degradación de las fracciones soluble e insoluble de los alimentos, midiendo la fermentación del alimento o su desaparición en función del volumen de gas producido, los fermentadores continuos permiten estudios más complejos. Algunos ejemplos de las aplicaciones de los sistemas de fermentación *in vitro* se resumen en la Tabla 2.1.

El estudio de los procesos digestivos de los rumiantes ha estado tradicionalmente ligado al uso de individuos fistulados en diferentes niveles del tubo digestivo (rumen, abomaso, duodeno o íleon, principalmente). Estas técnicas que implican intervenciones quirúrgicas invasivas son cada vez más difíciles de justificar. La Directiva 86/609/CEE ya regula y acota la utilización de animales experimentales desde hace más de dos décadas, y es de esperar que en los próximos años se endurezcan aun más las limitaciones, atendiendo a razones éticas y de bienestar animal.

Estos límites son el principal inconveniente asociado a la realización de ensayos *in vivo* en la actualidad, aunque se pueden citar otros, también muy importantes, como la variabilidad individual inherente a los animales y su elevado coste de mantenimiento, la dificultad de control y monitorización sobre las condiciones ruminales *in vivo*, las grandes cantidades que se necesitan de las dietas experimentales, la dificultad para establecer amplios periodos de adaptación de los animales a dichas dietas, su poca idoneidad para evaluar alimentos a gran escala, la complejidad para calcular el balance proteico (hay que extraer la aportación de la proteína endógena, que es muy difícil de estimar en estas condiciones) y, en general, el elevado coste en términos de tiempo, económicos y humanos (Carro *et al.*, 1994; Karunanandaa y Varga, 1996).

En las técnicas de simulación *in vitro* el grado de control sobre las unidades de fermentación es mucho mayor, el coste de mantenimiento (económico, temporal y de personal) se reduce considerablemente, las cantidades de dietas experimentales son mucho menores y no existe el componente de proteína endógena a la hora de calcular el balance proteico.

#### **2.2.4. Consideraciones previas al uso de los sistemas *in vitro*. ¿Cuál escoger?**

Como apunta Czerkawski (1986), el número de veces que un aparato se pone a punto parece variar inversamente con la complejidad del diseño. A la hora de afrontar un estudio de fermentación *in vitro* hay que encontrar un equilibrio entre el grado de simplicidad del sistema, que dependerá del número de variables que se quieran controlar, y la precisión en la simulación que se quiera obtener. El grado de homogeneidad en los resultados será mayor cuanto más sencillo sea el sistema (Czerkawski, 1986). Los aparatos deben estar adaptados a los parámetros específicos que se deseen medir, y hay que tener en cuenta, además, que el coste económico varía mucho dependiendo del modelo elegido y del grado de simplicidad de este. En un sistema sencillo se pueden hacer un mayor número de réplicas en cada experimento, dado que sus costes son menores y su manipulación resulta menos engorrosa. Según Czerkawski (1986), resulta conveniente utilizar orientativamente los sistemas sencillos para ensayos previos, o para trabajos de monitorización o valoración, y los más complejos, para realizar experimentos básicos de la función ruminal.

#### **2.2.5. ¿Cómo se clasifican los sistemas *in vitro*?**

Aunque existen diferentes formas de clasificar de los sistemas de cultivo *in vitro* (Czerkawski, 1986; Blanchart *et al.*, 1989), habitualmente estas clasificaciones se basan en si el sistema es abierto o cerrado (es decir, si los gases liberados durante la

fermentación escapan al ambiente o, por el contrario, son 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 (una o más semanas, o incluso varios meses) o por el contrario está limitada a unas horas o unos pocos días, hecho que depende de si existen entradas de alimento y solución tampón al sistema y salida de efluentes o no. En realidad, y pese a estas acotaciones, podría decirse que existen tantos sistemas de fermentación artificial como modelos han propuesto los diferentes autores en la bibliografía.

#### **2.2.6. Estudiando la degradabilidad ruminal en el laboratorio**

Los primeros estudios que se llevaron a cabo utilizando técnicas *in vitro* fueron los de degradabilidad ruminal o intestinal de los alimentos. Entre ellos se pueden citar técnicas como la de la bolsa de nailon, las técnicas de producción de gas, los cultivos continuos, los métodos enzimáticos, la electroforesis en gel y el espectro de infrarrojo cercano, en el caso de la predicción de la digestión ruminal. En cuanto a la estimación de la digestión de la proteína en el intestino, se han desarrollado técnicas como son las bolsas móviles *in situ*, métodos enzimáticos y el estudio del quimo, entre otros.

A continuación se revisarán aquellos métodos *in vitro* de uso más extendido y que han contribuido de forma más patente al desarrollo de la simulación de la fermentación ruminal, o aquellos que forman parte de los experimentos de la presente Memoria de Tesis Doctoral.

Dado que degradabilidad de los alimentos en el rumen y su digestión post ruminal pueden estimarse por métodos biológicos que simulen estos procesos, hace décadas los investigadores encontraron una aplicación importante de las técnicas *in vitro* en estos estudios (Menke *et al.*, 1979; Crawford *et al.*, 1983). La utilización de los forrajes es muy dependiente de la degradación microbiana en el interior del rumen, y por tanto la descripción de los forrajes en términos de sus características de degradación proveería de una útil base para su evaluación (Hovell *et al.*, 1986). De esta forma, es posible seguir la respuesta metabólica de un alimento individual evitando la influencia ejercida por otros alimentos, y por lo tanto describir su propio valor nutritivo y características. Así, pueden determinarse los productos derivados del metabolismo de un alimento y definirse correctamente su contribución a la dieta. También pueden evaluarse dietas compuestas por diferentes alimentos. Aunque según Czerkawski (1986), un aparato usado para medir la digestibilidad *in vitro* no está diseñado para estudiar la función ruminal y estos métodos sirven para estimar la digestibilidad potencial de los alimentos

sin tener en cuenta los procesos de la dinámica ruminal, también es posible, en algunos casos, realizar un estudio de esta dinámica.

Existen varios métodos principales para determinar *in vitro* el valor nutritivo de los alimentos para rumiantes. El principio de determinación de la degradabilidad o la fermentabilidad potencial de un alimento midiendo el gas producido en un cultivo fue desarrollado en primer lugar por autores como Mc Bee (1953) y Hungate (1966). Trei *et al.* (1970), Jouany y Thivend (1986) y Beuvink y Spoelstra (1992) adaptaron las primeras técnicas añadiendo dispositivos manométricos (basados en el desplazamiento de un volumen de agua) a las botellas para medir el gas producido.

En el año 1963, Tilley y Terry publicaron un trabajo en el que se describía una sencilla técnica para la determinación *in vitro* de la degradabilidad de la materia seca y de la materia orgánica de pequeñas cantidades de sustrato incubadas en recipientes (tubos o botellas) de vidrio en presencia de inóculo ruminal, pepsina, distintas cantidades de solución amortiguadora, minerales y una solución reductora. La fermentación se estimaba por desaparición gravimétrica del sustrato.

En el año 1974, Wilkins desarrolló una técnica diferente en la que la fermentación tenía lugar en una vasija o botella selladas; el sistema poseía un transductor de presión que medía automáticamente la acumulación de presión en el espacio de cabeza del recipiente y una válvula conectada al tapón de metal de un tubo de ensayo que contenía inóculo y solución tampón. Esta forma de medir la presión con un sensor o un transductor ha sido ampliamente adoptada por muchos autores como un método sencillo y bastante sensible de determinar la cinética de fermentación. Aunque este método (Wilkins, 1974) se desarrolló para la detección de microorganismos en muestras clínicas y para realizar pruebas de esterilidad en alimentos, creó una base para el desarrollo del método de transductor de presión para la evaluación de alimentos.

También se han descrito otros sistemas de registro de la presión de forma semi-automática o automática (Pell y Schofield, 1993; Cone *et al.*, 1996; Mauricio *et al.*, 1999; Davies *et al.*, 2000). Los sistemas más simples requieren la medida manual de la presión del espacio de cabeza (Theodorou *et al.*, 1994). En las técnicas descritas por Theodorou *et al.* (1994), Cone *et al.* (1996) y Davies *et al.* (2000), los gases acumulados en este espacio se liberan a tiempos pre-determinados, o cuando se alcanzan umbrales también delimitados previamente. La presión acumulada, los tiempos de liberación o el número de veces que el gas es liberado son registrados, y estos datos se utilizan para calcular el volumen de gas producido de forma acumulativa.



El método de Tilley y Terry (1963) ha sido uno de los más utilizados y sigue siendo muy popular, debido principalmente a su precisión para predecir la digestibilidad *in vivo* de algunos alimentos para rumiantes, especialmente forrajes (Beever y Mould, 2000). Sin embargo, este método es de “punto final”; es decir, no proporciona información acerca de la cinética de degradación en el rumen (dos muestras de alimento pueden presentar la misma degradabilidad después de 48 o 96 horas de incubación, pero su velocidad de degradación puede haber sido completamente diferente). El hecho de que un alimento sea fermentado (y degradado) en el rumen más rápidamente debería conducir a un aumento en su tasa de pasaje, lo que redundaría en un aumento en el consumo voluntario del mismo, y por ello es un factor importante a tener en cuenta.

La digestibilidad *in vivo* no permite cuantificar qué fracción del alimento ha sido degradada en el rumen y cuál en el sistema digestivo posterior, porque *in vivo* se estima la digestibilidad en todo el tracto digestivo. Sin embargo, *in vitro* se estima la degradabilidad en el rumen.

Otra de las formas de estimar la degradabilidad ruminal es el método de la bolsa de nailon o dacron, también llamado *in situ* o *in sacco*, que consiste en la introducción del alimento a estudiar en bolsas de poliéster o de nailon de tamaño de poro conocido, que serán colocadas un número determinado de horas en el interior del rumen, para posteriormente ser retiradas. La desaparición del sustrato se calcula por diferencia de peso seco de las bolsas antes y después de haber sido incubadas, y proporciona una útil manera de predecir las tasas y el grado de desaparición de los constituyentes del alimento, así como el consumo voluntario (Bailey e Hironacka, 1970; Mehrez y Ørskov, 1977; Ørskov y McDonald, 1979; Ørskov, 2000). Dado que la incubación se realiza en el interior del animal, la técnica de la bolsa de nailon no puede ser considerada un método *in vitro*, aunque su uso continúa estando muy extendido.

Givens (1994) considera que los modelos usados frecuentemente para describir la cinética de degradación de los alimentos o de fracciones de los mismos como el de Ørskov y McDonald de 1979 describen muy pobremente los perfiles de degradación de N de alimentos altos en N soluble. Podemos encontrar, asimismo, errores sustanciales en aquellos valores obtenidos en las primeras etapas de la incubación, debidos a pérdidas de peso del alimento por solubilidad y a la baja adherencia de las SAB en estas horas iniciales, que nos pueden conducir a la distorsión de los resultados (Ørskov y Ryle, 1990).

Cuando se introdujo el sistema estadounidense ANKOM (Daisy II, ANKOM Corp.) en el mercado, se buscaba simplificar la estimación de digestibilidad *in vitro*. El método consiste en digerir muestras de alimentos en pequeñas bolsas dentro de frascos de vidrio que rotan permanentemente dentro de una cámara aislada y mantenida a 39°C. Esta técnica aporta predicciones relativamente precisas de degradabilidad aparente y verdadera (Julier *et al.*, 1999; Vogel *et al.*, 1999). Posteriormente, otros autores adaptaron el sistema para estimar la tasa de degradación de la materia seca y otras fracciones de los alimentos, retirando las bolsitas a diferentes tiempos de incubación (Mould y Nordheim, 1998) o para evaluar el efecto de aditivos enzimáticos (Colombatto, 2007), por citar sólo dos ejemplos. Esta técnica presenta algunos inconvenientes similares a los descritos para la técnica de la bolsa de nailon, es decir, la eventual pérdida de partículas solubles o muy pequeñas del alimento, factor que limita el tipo y el procesado de las muestras a analizar. Además, los posibles efectos asociativos entre alimentos incubados en un mismo frasco de fermentación podrían influenciar los resultados, aunque Holden (1999) no encontró evidencias de ello. A pesar de esto, la técnica ANKOM representa un medio rápido y conveniente para determinar la tasa y extensión de la degradación de alimentos *in vitro*.

#### **2.2.7. Técnicas de producción de gas *in vitro* (IVGPT)**

Como se ha mencionado previamente, cuando se incuba en el laboratorio un alimento con fluido ruminal en condiciones de anaerobiosis y a una temperatura similar a la del rumen, los carbohidratos son fermentados por los microorganismos, produciéndose VFA (principalmente de cadena corta, acético, propiónico y butírico; Wolin, 1960; Beuvink y Spoelstra, 1992; Blümmel y Ørskov, 1993), gases (fundamentalmente CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>; 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 (y tradicionalmente ha sido) 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 a través del tamponamiento de los ácidos con el bicarbonato del buffer, proceso en el cual se libera CO<sub>2</sub>, aproximadamente el 60% de la producción total de gas según Getachew (1998). Aunque 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), las proporciones molares de los principales VFA producidos (acético, propiónico y

butírico) dependen del tipo de sustrato (Beuvink y Spoelstra, 1992; Blümmel y Ørskov, 1993) y es por esto que la relación molar Ac:Pr ha sido tradicionalmente utilizada para evaluar diferencias en la fermentación debidas al sustrato. Los carbohidratos de rápida fermentación producen cantidades relativamente elevadas 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). Si la fermentación conduce a una mayor proporción de acético, habrá, de forma concomitante, un aumento en la producción de gas en comparación con aquellos alimentos que produzcan una mayor cantidad de propiónico. En otras palabras, cambios en la producción de gas reflejarán cambios en la proporción de los VFA que se producen durante la fermentación.

En las IVGPT se pueden aplicar las leyes estequiométricas de equilibrio, debido a que los productos de la fermentación derivan del sustrato que se incuba. El equilibrio estequiométrico permite el cálculo teórico de las cantidades producidas en el equilibrio de VFA y gases (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 VFA, podremos calcular las cantidades de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> esperadas como consecuencia de la fermentación ruminal.

Como se ha visto, la estrecha relación entre fermentación ruminal y producción de gas ha sido reconocida hace más de un siglo (Tappeiner, 1882), pero la historia de las técnicas de medición del gas de la fermentación ruminal comenzó a principios de la década de los cuarenta (Quin, 1943). Gran parte de los primeros estudios en la medida del gas se centraron en el uso de mediciones manométricas. Mc Bee (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 responden a cambios en la dieta del animal. Utilizando este mismo método, este autor examinó la preferencia de los microorganismos por diferentes componentes del alimento, y encontró que aquellos que son capaces de fermentar la celulosa también pueden degradar las hemicelulosas, pero no al contrario, es decir, que no todos aquellos que fermentan las hemicelulosas pueden degradar la celulosa. El-Shazly y Hungate (1965) midieron las tasas de fermentación ruminal utilizando el método del volumen manométrico constante, en el que diferentes cantidades de heno

eran incubadas con contenido ruminal y soluciones de sales minerales. En 1969, Czerkawski y Breckenridge desarrollaron un aparato para medir manométricamente la presión con el fin de investigar el efecto de los VFA en la fermentación de la pulpa de remolacha y la sacarosa por una mezcla de microorganismos ruminales. Mediante este método, estos autores vieron 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 no resultaba sencillo hacer más de dos incubaciones múltiples durante una semana de trabajo, ni analizar 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 *a posteriori*.

En 1979 Menke *et al.*, a partir de datos provenientes 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 (una ecuación de regresión múltiple), aunque aún no se ha encontrado una ecuación de regresión que prediga satisfactoriamente 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; Fernandez-Rivera, 1997; Macheboeuf *et al.*, 1997; Romney *et al.*, 1997) han observado también esta correlación significativa entre la medida de gas *in vitro* y la digestibilidad *in vivo*. Las IVGPT 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).

El modelo exponencial de Ørskov y McDonald (1979) ha sido ampliamente utilizado en la evaluación de alimentos para rumiantes con el fin de describir la cinética de degradación medida con la técnica de la bolsa de nailon, pero también para describir

la cinética de producción de gas (Siaw *et al.*, 1993; Khazaal *et al.*, 1993). Este modelo está basado en cinéticas de primer orden (cuando la reacción depende de la concentración de un solo reactivo, que se descompone en uno o más productos) asumiendo una tasa fraccional constante de fermentación (Groot *et al.*, 1996). Dado que las partículas del alimento no son homogéneas y poseen diferentes tasas de fermentación, la asunción del modelo exponencial no es universalmente válida.

En el método de Theodorou *et al.* (1994), una aguja hipodérmica conectada a un transductor de presión digital se inserta manualmente a través de un tapón de goma (septo) para medir la presión acumulada en el espacio de cabeza del recipiente de fermentación. El volumen de gas se determina registrando el volumen de gas desplazado dentro del cilindro de la jeringa cuando el émbolo se va moviendo por efecto de la presión, hasta que la presión en el espacio de cabeza iguala a la atmosférica y el émbolo se detiene. Este método ha sido posteriormente modificado por algunos autores, como Williams *et al.* (1996). El método de Theodorou *et al.* (1994) requiere sólo un transductor de presión, mientras que en la técnica descrita por Pell y Schofield (1993) cada botella de incubación tiene 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, aunque la preparación de la técnica es laboriosa. En las técnicas de Pell y Schofield (1993) y Theodorou *et al.* (1994), la presión acumulada no se libera, 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.

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 (o no necesariamente) contribuir a la fermentación, las IVGPT 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; Makkar *et al.*, 1995). En las IVGPT se puede estudiar la cinética de la fermentación en una cantidad relativamente pequeña de sustrato, 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, las IVGPT 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, son menos dependientes de animales fistulados que otros métodos *in vitro* que requieren una mayor cantidad de inóculo al comienzo del experimento. La popularidad de las IVGPT radica en la posibilidad de ejercer un buen control experimental, la capacidad de evaluar un gran número de sustratos, la información de la cinética obtenida y su relativamente bajo coste (Dijkstra *et al.*, 2005).

Al ser un sistema cerrado, en las IVGPT 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, pero las primeras horas se caracterizan por presentar altos valores de pH, no pudiendo así reproducir las oscilaciones de pH típicas del rumen; la incubación se realiza a pH entre 6,5 y 6,9. Además, existen limitaciones en cuanto a las muestras, pues muchas no pueden ser fácilmente manipuladas (Getachew, 1998).

Existen sistemas semi-automatizados como el presentado por Mauricio *et al.*, quienes en 1999 describieron un aparato que permitía incubar 336 frascos al mismo tiempo, lo cual reducía el tiempo necesario para construir los perfiles de fermentación de un elevado número de alimentos. Las ventajas de la automatización son, sin embargo, motivo de controversia. Las IVGPT automatizadas permiten la evaluación de un número muy elevado de muestras o tratamientos, pero esto conlleva que sean más complejos, más intensivos en cuanto a trabajo y más costosos a nivel económico, por lo que algunos autores, autores como por ejemplo Getachew (1998), sugieren que los métodos automatizados 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.

Además, existe también una falta de consenso sobre distintos aspectos de las IVGPT y sus verdaderos alcances (Beever y Mould, 2000; Pell *et al.*, 2000). El principal error que se comete es la asunción de 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, porque la producción de gas depende de la composición del sustrato, de las comunidades microbianas que se establezcan en el cultivo y de la utilización de los nutrientes por parte de las bacterias 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  $\text{NH}_3$  en forrajes ricos en proteína puede hacer decrecer la producción de gas por una reacción con los VFA (Schofield 2000). Como consecuencia de esto, varios autores concluyeron que la producción de gas *in vitro* provee poca información aparte de la estimación de las tasas de fermentación, lo cual llevó a sugerir que los datos obtenidos deberían ser complementados con datos de degradación de los sustratos, perfiles de VFA 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 FDN, FAD, proteína, etc.) permitirá ofrecer una información precisa acerca del valor nutritivo de los alimentos. En este enfoque, la determinación del residuo nos informa de cuánto sustrato se utiliza en la fermentación, y la medida de gas refleja cuánto de este sustrato fermentado se convierte en VFA y gases. Ha sido recientemente 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 puede utilizarse para predecir el reparto del alimento degradado entre la síntesis de proteína microbiana y los VFA (proporción del alimento que es fermentado y del que es derivado al crecimiento microbiano), así como el  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  y  $\text{H}_2$  producidos.

Además de haber sido ampliamente utilizadas para evaluación de alimentos (Pell *et al.*, 1998), el uso de las IVGPT se está incrementando para propósitos más allá del original, como la estimación de la actividad microbiana (Williams *et al.*, 2000), la evaluación de la toxicidad de algunos compuestos secundarios (Ammar *et al.*, 2004) y el estudio del efecto de algunos aditivos alimentarios en la fermentación ruminal (Colombatto *et al.*, 2003).

#### **2.2.8. Fermentadores**

Ya en 1965, Hobson reconoció la analogía entre el rumen y los sistemas de cultivo continuo, y posteriormente se han hecho numerosos intentos para diseñar fermentadores artificiales que permitieran cultivos mantenidos en el tiempo. Estos sistemas fueron más simples en el comienzo, aunque paulatinamente fueron derivando a métodos más complejos, en los que los diferentes autores iban introduciendo modificaciones con el

fin de obtener resultados cada vez más comparables 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.

Se han propuesto muchos modelos diferentes, entre ellos los de Slyter *et al.*, 1964; Aafjes y Nijhof, 1967; Weller y Pilgrim, 1974; Czerkawski y Breckenridge, 1977; Ewart, 1974; Hoover *et al.*, 1976a, b; Crawford *et al.*, 1980a, b; Abe y Kurihara, 1984; Stern y Satter, 1984; Czerkawski, 1986; Merry *et al.*, 1987; Theather y Sauer, 1988; Muphy y Lingren, 1997; Fuchigami *et al.*, 1989 o Hino *et al.*, 1993.

Mientras que, como se ha señalado, los cultivos de tipo batch son discontinuos (sin entradas ni salidas de sólido o líquido), los fermentadores son cultivos de tipo continuo que sí permiten estas entradas y salidas, y se pueden clasificar en: 1) Sistemas de fermentación y flujo continuos (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 pueden mantener tasas de dilución diferentes, 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 velocidades de flujo elevadas; y 2) Sistemas de fermentación continua y flujo semi continuo, con entrada continua de solución tampón, entrada y salida discretas de sustrato (alimentación intermitente) y salida continua del efluente líquido, cuyo máximo exponente es el Rusitec (Rumen Simulation Technique; Czerkawski y Breckenridge, 1977).

En los sistemas de cultivo continuo, los fermentadores se inoculan al comienzo del experimento con fluido ruminal líquido o 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, a pesar de que el flujo de salida del rumen en condiciones fisiológicas no lo es. El alimento se administra (automática o manualmente) en dosis repartidas en el tiempo (Hoover *et al.*, 1976a, b; Teather y



Saber, 1988) o mediante introducción discreta en bolsas de nailon, como en el Rusitec (Czerkawski y Breckenridge, 1977).

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 para alcanzar una situación de equilibrio, además de un equipamiento complejo (bomba peristáltica, sistema de regulación constante del pH, agitación, control de temperatura o flujo continuo de gas) para mantener las condiciones de simulación del ambiente ruminal.

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, y por eso su uso no está muy extendido.

En los cultivos continuos, altas tasas de degradabilidad del sustrato incrementarán la tasa absoluta de crecimiento de los microorganismos y aumentarán la masa microbiana, pero en el estado estacionario la tasa fraccional de crecimiento de los microorganismos se iguala a la tasa fraccional de desaparición. La vía más importante de eliminación desde el rumen es el paso a tramos posteriores del tracto digestivo. Consecuentemente, en cultivos continuos y semicontinuos la eficiencia de síntesis microbiana estará relacionada con la tasa de pasaje más que con la tasa de degradación (Dijkstra et al., 2005).

#### 2.2.8.1 Sistemas continuos de flujo semicontinuo. Rusitec

Entre los fermentadores artificiales que existen, el sistema de flujo semicontinuo Rusitec, creado por Czerkawski y Breckenridge en 1977, es uno de los más conocidos y el que en mayor número de trabajos se ha empleado, en su versión original o con modificaciones (por ejemplo, Blanchart y Vignon (1984) o Carro *et al* (1992, 1995). Según Czerkawski (1986), un Rusitec es un rumen “sin pared ruminal y sin dientes” (¡!).

En este sistema, la entrada de solución buffer 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 discreta, manualmente, cada 48 horas en la mayor parte de los trabajos. El alimento se puede incubar en conjunto o bien

separándolo según su naturaleza, por ejemplo el alimento fibroso en una bolsa y el concentrado en otra, ambas dentro del mismo fermentador. Según Czerkawski y Breckenridge (1979b) la separación espacial de los componentes del alimento no resulta en una fermentación anormal.

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* produjo comunidades microbianas que representan el ecosistema natural del rumen. Sin embargo, se necesita una estandarización del procedimiento de muestreo, los parámetros de incubación, etc para permitir una mejor comparación de los datos entre laboratorios.

Czerkawski (1986) resume las ventajas de su sistema en algunos puntos clave. Según él, el Rusitec da al operador el máximo control sobre las condiciones experimentales, por encima de los 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 (cada día o cada dos días) se conoce de forma precisa, porque se retira manualmente. Permite realizar cuatro 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). Según Carro *et al.* (2005) las fluctuaciones del pH que ocurren en el Rusitec podrían ser más similares a las que ocurren *in vivo* en comparación con un CCF. Además, según Czerkawski (1986) el Rusitec es “simple de construir y fácil de manipular”.

Sin embargo, durante el periodo de adaptación las relaciones entre los diferentes microorganismos pueden cambiar (Prevot *et al.*, 1994), y de hecho hay evidencias de que lo hacen, por varias razones. El tiempo requerido para alcanzar el estado estacionario (cuando la tasa de dilución del sistema se equilibra con la de crecimiento de los microorganismos o el momento en el que la salida diaria de productos de fermentación no cambia significativamente de un día para otro en varios días consecutivos) es de 4 a 6 días según Czerkawski (1977), pero este dato, así como el

tiempo elegido para permitir la adaptación del sistema, varía dependiendo de los autores. El tiempo de adaptación representa otra dificultad en el uso del Rusitec, y mientras la comunidad microbiana se adapta a las nuevas condiciones, la microflora alcanza un nuevo (y diferente) equilibrio (Prevot *et al.*, 1994).

Al comienzo de un experimento, se añade un gran volumen de saliva artificial al fluido ruminal, conduciendo a un rápido aumento en el pH y modificación de las condiciones respecto a las existentes en el rumen en el momento de recogida del inóculo. La entrada continua de solución tampón (Blanchart *et al.*, 1989) para simular la tasa de renovación de la digesta ruminal reemplaza muy rápidamente el fluido ruminal utilizado como inóculo, estableciendo condiciones nuevas y diferentes que tienen una influencia directa sobre la comunidad microbiana. La regulación del pH depende de esta entrada de saliva gracias a las bombas peristálticas, pero resulta muy difícil el mantenimiento del pH en valores constantes a lo largo de un experimento, dado que cada fermentador depende de una entrada de saliva independiente, que puede sufrir ligeras variaciones con respecto al resto a medida que pasan las horas. Además, en el Rusitec es necesario detener el motor del aparato y abrir los fermentadores (y por tanto interrumpir el proceso) una vez al día para introducir nuevas bolsas de nailon con alimento. Esta operación expone a los microorganismos ruminales al oxígeno y, por lo tanto, supone un estrés sustancial para los anaerobios estrictos, siendo otra de las razones por la cual el equilibrio entre las comunidades microbianas (en este caso la relación anaerobios estrictos/ facultativos) se ve alterado. Por ejemplo, la entrada de O<sub>2</sub> en los fermentadores puede promover el crecimiento de algunos estafilococos y estreptococos (los anaerobios facultativos más frecuentemente encontrados en el rumen según Stewart y Bryant, 1988), haciendo que se conviertan en predominantes desde las primeras horas de incubación.

#### 2.2.8.2. Sistemas continuos de flujo continuo (simple o doble)

En los sistemas de flujo continuo 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, porque salen 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 trabajos, entre

ellos los de Hoover *et al.*, 1976 a, b; Crawford *et al.*, 1980a, b; Hoover *et al.*, 1982 y 1989; Hannah *et al.*, 1986; Merry *et al.*, 1987 y 1990; Mansfield *et al.*, 1984; Calsamiglia *et al.*, 1995 y 1999; Mansfield *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1998; Carro y Miller, 1999; Schadt *et al.*, 1999).

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 (1986) el uso de membranas semipermeables tiene inconvenientes: es difícil que la membrana no sea atacada, no se puede usar sustrato sólido y es difícil controlar el flujo por ósmosis.

#### 2.2.8.3. Método VIVAR

Es un rumen artificial *in vivo*. Consiste en incubar sustratos en el interior de recipientes de porcelana, acero inoxidable o vidrio que se colocan dentro del rumen de animales canulados. Se utilizó en origen para estudio de digestión de forrajes y sustratos puros y estudios de ecología microbiana, entre otros (Fina *et al.*, 1958; Teresa, 1959; Fina *et al.* 1962), aunque actualmente está en desuso.

#### 2.2.8.4. Sistemas de cultivos modificados

Algunos autores (Gizzi *et al.*, 1998; Fondevila y Pérez-Espés, 2008) han modificado los fermentadores o los cultivos discontinuos proponiendo cambios que permiten introducir alimento o solución amortiguadora y a la vez retirar los productos de fermentación, sin necesidad de abrir los fermentadores o recipientes ni detener el sistema. La ventaja más importante de estos aparatos es la habilidad para mantener las condiciones anaerobias durante todo el periodo de fermentación, la posibilidad de introducir alimento sin necesidad de interrumpir el proceso y sin exponer el contenido al oxígeno atmosférico, y controlar y corregir automáticamente la acidez producida.

#### 2.2.8.5. Simulación en monogástricos

La primera versión de un sistema que simulara la fermentación en animales no rumiantes fue la propuesta por Iversen *et al.* en 1989, aunque su modelo sólo controla el flujo de fase líquida, y se enfoca en el estudio de cambios en las comunidades microbianas, y no en la estimación de los procesos fermentativos. El Colon Simulation Technique (Cositec) es una adaptación del Rusitec para los monogástricos creado por Stück *et al.*, en 1995, que posteriormente ha sido ampliamente utilizado por varios grupos de trabajo.

### **2.2.9. 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). En el laboratorio, algunos de los más importantes son la anaerobiosis, la temperatura, el pH, la agitación, una adecuada capacidad tampón del medio, la relación forraje:concentrado y la cantidad de alimento que se incuba, que debe fijarse en relación al volumen de fluido ruminal tamponado (Getachew, 1998). Los sistemas *in vitro* que no maximicen la cinética de digestión pueden no detectar diferencias en la degradabilidad del sustrato (Grant y Mertens, 1992); es por ello que se debe maximizar la digestión *in vitro*, y esto depende de varios factores, entre ellos la dilución del inóculo, el tipo de buffer utilizado, el tamaño de partícula y de muestra, el tipo de malla utilizada para moler el alimento y factores relacionados con el animal donante (especie, raza, estado fisiológico, etc). En los cultivos continuos, además de los factores mencionados, existen otros como el ritmo de movimiento de los recipientes o bolsas con la comida dentro del fermentador (en el Rusitec), la tasa de dilución y el tiempo de retención del sólido, que tienen impacto en la actividad fermentativa de la comunidad microbiana. Las variaciones en las condiciones de los cultivos *in vitro* pueden afectar a las comunidades microbianas que en ellos se establecen, sabiendo de antemano que el porcentaje de especies bacterianas no identificables aumenta en estos sistemas en comparación con el rumen (Slyter y Putnam, 1967). Según Getachew (1998) es necesaria la estandarización de procedimientos entre y dentro de los laboratorios, así como el desarrollo de medios matemáticos para corregir diferencias.

#### 2.2.9.1. Preparación y molienda del alimento

La preparación de las muestras puede tener un efecto en la dinámica de fermentación. Por ejemplo, Lowman *et al.* (2002) indicaron que el uso de muestras desecadas en cultivos de tipo discontinuo sobreestimaba la fermentabilidad del alimento con respecto a las muestras frescas o congeladas, debido a que las primeras se habían dañado en el proceso de secado. Este tipo de factores deben ser considerados cuando se utilicen los datos obtenidos *in vitro* para predecir la fermentabilidad de un alimento *in vivo*.

#### 2.2.9.2. Medio, buffer, inóculo

Debe establecerse una distinción entre el medio de cultivo (solución que contiene buffer, elementos traza, fuentes de proteína o agentes reductores) y el buffer o solución

tampón, que es uno de los componentes del medio (Williams, 1998). Si el buffer lleva 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. En esta línea, Omed *et al.* (1998) sugirieron que el fosfato podría reemplazar totalmente al bicarbonato en el buffer, aunque los microorganismos requieren ambos para su crecimiento (Williams, 1998). Los fosfatos también aumentan en cierto grado la digestión de la fibra (Kennedy *et al.*, 2000) y por lo tanto también podrían alterar la fermentación. En los experimentos con cultivos discontinuos que se incluyen en la presente Memoria, el medio utilizado fue el de Goering y Van Soest (1970). Este medio ha demostrado no producir significativamente más gas en comparación con otros, pero sí ser capaz de mantener el pH final por encima de 5,5, mientras que el resto no lo consiguió (Rymer *et al.*, 2005).

Grant y Mertens (1992) sugirieron la necesidad de la existencia en el medio de factores (micronutrientes, fuentes de N, etc.) para no limitar la fermentación. Dryhurst y Wood (1998) observaron que el medio de incubación, incluyendo la contribución del N del alimento, debería contener al menos 80mg N/ L, si se quiere maximizar la tasa de degradación de los carbohidratos. Este valor es mayor de los 50g N/ L recomendados por Satter y Slyter (1974), determinado con CCF, pero como apuntaron Dryhurst y Wood (1998), el requerimiento de N es dependiente del aporte de carbohidratos. Cuanto más se incrementa el aporte de carbohidratos (especialmente los rápidamente fermentables), más N requieren los microorganismos para alcanzar tasas óptimas de crecimiento. Se debe añadir suficiente N al medio para asegurar que los carbohidratos del sustrato no estén en exceso, de forma que la vía metabólica de fermentación adoptada sea consecuencia del alimento y no el resultado de un medio deficiente en N. Es por ello que habitualmente se añade a los medios de cultivo caseína o tripticasa como fuente de aminoácidos y péptidos. En los experimentos con cultivos discontinuos incluidos en esta Memoria, la tripticasa presente en la composición original de Goering y Van Soest (1970) no fue añadida, debido a que el alimento contenía cantidades suficientes de proteína.

En los cultivos continuos la entrada constante de solución tampón simula la producción de saliva en el rumiante. *In vivo*, las dietas forrajeras estimulan la

producción de saliva, mientras que aquellas con elevada proporción de carbohidratos no estructurales hacen descender su producción. *In vitro*, lo habitual es utilizar la misma cantidad de saliva independientemente de la dieta, aunque existen algunos trabajos (Colombatto *et al.*, 2003; Carro *et al.*, 2009) en los que se ha establecido diferente capacidad tampón del sistema en función de la dieta administrada a los fermentadores, a través de cambios en la composición de la saliva artificial. Aumentar la tasa de dilución de la fase líquida conlleva aumentar la velocidad de infusión de saliva artificial, y esto habitualmente provoca un aumento del pH por aumento de la capacidad tampón, lo cual puede llevar a distorsionar los resultados de la simulación (Carro *et al.*, 2009).

#### 2.2.9.3. pH

Este factor influye mucho en la fermentación ruminal, tanto por el valor a lo largo de la fermentación (de Veth y Kolver, 2001; Yang *et al.*, 2002), como por el valor límite más bajo y el tiempo que permanece en ese valor (Cerrato-Sanchez *et al.*, 2007) y por sus fluctuaciones (Calsamiglia *et al.*, 2002). Por ello, el pH debe ser un factor clave a controlar en los sistemas de simulación. Este control, dependiendo de los trabajos, puede ser más o menos riguroso; en algunos casos es el propio sistema el que puede mantener el pH automáticamente mediante la adición de ácidos o bases débiles (Calsamiglia *et al.*, 2002). En otros, el pH fluctúa en función de varios factores que lo influyen, como son la dieta, la tasa de dilución, etc. Conseguir fluctuaciones del pH similares a las observadas *in vivo* puede suponer un avance importante en el perfeccionamiento de la simulación ruminal *in vitro*.

#### 2.2.9.4. Los aparatos

Pese a las grandes diferencias entre aparatos utilizados y las interacciones de los laboratorios involucrados, Rymer *et al.*, 2005 sugirieron que el perfil de producción de gases producido con una IVGPT puede ser corregido y adaptado a otros aparatos estandarizados. Sin embargo, los fermentadores continuos presentan tantas diferencias en su construcción y funcionamiento, que los resultados obtenidos son difícilmente comparables.

#### 2.2.9.5. Los animales donantes

Las condiciones de manejo de los animales donantes, su dieta y el momento de recogida del inóculo pueden tener efecto en la consistencia de los resultados entre pruebas. Aunque la microbiota ruminal de las especies similares (ovejas, cabras) que están confinadas en contacto estrecho y que consumen alimentos parecidos o iguales puede tender a la uniformidad, las diferencias en la dentición, el comportamiento

alimenticio y de masticación y rumia, la fisiología del tracto digestivo, las dimensiones del rumen y el tiempo de retención propios de cada especie, pueden influir en las comunidades microbianas (Ammar *et al.*, 2004). Por tanto, en las técnicas de fermentación ruminal *in vitro*, la especie a la que pertenece el animal donante puede afectar a los resultados. Pese a que el uso de blancos y estándares puede corregir alguna de las diferencias (Menke y Steingass, 1988), y las relaciones matemáticas permitirían la extrapolación de los datos de una especie a otra (Cone *et al.*, 2002), las tasas de fermentación basadas en inóculos de diferentes especies son diferentes, y no deberían utilizarse para los cálculos, estimaciones y ecuaciones matemáticas (Rymer *et al.*, 2005). 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, a no ser que el diseño experimental requiera lo contrario, alimentados con las mismas dietas. Además, las muestras deben ser tomadas de varios animales y después 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). Otra opción es considerar el inóculo como efecto aleatorio en el diseño y análisis estadístico.

La dieta que reciben los animales donantes también es importante. El inóculo obtenido de animales que consumen una dieta rica en granos puede presentar, por ejemplo, mayor actividad degradativa del almidón *in vitro* en comparación con el inóculo procedente de animales que consumen dietas fibrosas (Cone *et al.*, 1989; Richards *et al.*, 1995).

#### 2.2.9.6. Recogida del inóculo

Numerosos autores (Warner, 1966 a, b; Bryant y Robinson, 1968; Leedle *et al.*, 1982; Payne *et al.*, 1992) han observado que las concentraciones de los microorganismos ruminales sufren cambios cíclicos relacionados con la administración del alimento. Es necesario tener en cuenta esta información a la hora de recoger el inóculo ruminal para los experimentos *in vitro*. En las primeras horas tras la administración de alimento, se produce un marcado descenso en la cifra total de bacterias en el rumen. Warner (1966 a, b) atribuyó esto al hecho de que los animales fueran alimentados sólo una vez al día en lugar de hacerlo de forma frecuente, y al efecto de dilución de la comida, el agua de bebida y la saliva producida. Posteriormente, las cifras aumentan hasta alcanzar el máximo, cuando la tasa de crecimiento supera a la de dilución (Warner, 1966 a, b), para después descender nuevamente. Payne *et al.*



(1992) sugieren que el descenso en la actividad de un inóculo ruminal recogido poco tiempo después de alimentar al animal está relacionado con el bajo pH del rumen en el momento de muestreo.

Cone *et al* (1998) observaron que el momento de recogida del inóculo influía en los resultados obtenidos con las técnicas *in vitro*. Dado que existen diferencias en la actividad del fluido ruminal entre días (Menke y Steingass, 1988; Beuvink y Spoelstra, 1992), se incuban blancos (botellas sin sustrato) para corregir los valores de producción de gas en función del gas liberado por la fermentación del sustrato endógeno, permitiendo así comparaciones entre incubaciones completadas en diferentes días o en diferentes laboratorios (Menke y Steingass, 1998). Sin embargo, existe cierta controversia entre autores respecto al momento de recogida en relación con la actividad del inóculo. Mientras autores como Menke y Steingass (1988) sugirieron que existirá una buena actividad microbiana si los animales donantes han sido alimentados en las 16 horas previas, otros como Cone *et al* (1996) indican un aumento en la tasa de fermentación cuando el inóculo fue recogido inmediatamente después de la administración del alimento a los animales. Payne *et al.* (2002) observaron que el perfil de producción de gases de diferentes sustratos fue menos variable entre réplicas y entre semanas cuando el fluido ruminal fue recogido a las 4 o a las 8 horas después de alimentarse a los animales, comparado con el obtenido justo antes o 2 horas después de alimentarse. Sin embargo, Menke y Steingass (1988) vieron que al muestrear el contenido ruminal justo antes de la alimentación de los animales se redujo la variación en la composición y actividad del inóculo, siendo este el momento de recogida del inóculo en los trabajos pertenecientes a esta Memoria de Tesis Doctoral.

#### 2.2.9.7. El transporte del inóculo al laboratorio

Una vez extraído el fluido ruminal, debe guardarse en un recipiente que permita un almacenamiento de corta duración y que evite la exposición al aire y la luz y conserve la temperatura. También es importante vigilar que el incremento de la presión en el espacio libre del recipiente no fuerce al CO<sub>2</sub> a entrar en solución en el fluido, haciendo descender el pH (Rymer *et al.*, 2005). Además, el transporte debería resultar 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.

En cuanto a la posibilidad de conservar el inóculo para utilizarlo con posterioridad, Cone *et al.* (2000) encontraron que los volúmenes finales de gas fueron similares entre

fermentaciones *in vitro* llevadas a cabo con inóculo fresco y con otro almacenado durante 4 horas. Robinson *et al.* (1999) concluyeron que ningún método de almacenamiento dependiente de la temperatura mantendría la actividad del inóculo más allá de 48 horas en buenas condiciones para efectuar una fermentación *in vitro*. Por el contrario, Hervás *et al.* (2005) sugirieron que la conservación a 0° durante 3 ó 6 horas no tenía efecto negativo ni en los parámetros de fermentación ni en los degradativos, y que este método ofrecía una alternativa práctica al uso de material fresco, cuando resulta imposible utilizarlo en el momento de la recogida.

#### 2.2.9.8. La preparación del inóculo

Se ha observado que, en ocasiones, las comunidades microbianas existentes en el inóculo difieren de las del rumen (Ziemer *et al.*, 2000). Esto se debe a varios factores, entre ellos la forma de recogida del inóculo, en la cual si no se es cuidadoso no se recogerá una muestra representativa del conjunto de microorganismos ruminales (Sadet *et al.*, 2007). Por otra parte, en este sentido, un aspecto de gran influencia en la actividad microbiana del inóculo es el método de preparación.

Tanto en los BCRM como en los f, el inóculo se introduce en los sistemas previamente filtrado, es decir, se inoculan con la fase líquida. En los de flujo semicontinuo, como el Rusitec, se realiza una separación del inóculo en sus dos fases, líquida y sólida, y los fermentadores se inoculan con ambas, estando la segunda confinada en contenedores o bolsas de nailon.

Autores como Gizzi *et al.* (1998) no filtran el contenido ruminal antes de utilizarlo para sus cultivos, por dos motivos: la dificultad de filtrar en condiciones anaerobias y el hecho de que aproximadamente el 70-80% de las bacterias del rumen están asociadas a la parte sólida de la digesta (Forsberg y Lam, 1977; Craig *et al.*, 1987a), con el inconveniente de que, a la vez del inóculo, se introducen partículas que puedan estar en suspensión en el fluido ruminal y que pueden distorsionar los resultados. Sin embargo, en los BCRM, lo habitual es filtrar el inóculo a través de una o varias capas de nailon, gasa de queso, muselina o gasa quirúrgica, con el objetivo de eliminar las partículas groseras del alimento, que al fermentar junto con el alimento introducido en las botellas, 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 SAB. En ocasiones se homogeneiza el contenido antes de filtrarlo o se resuspende el residuo sólido en solución tampón y se filtra de nuevo, con el fin de obtener una mayor cantidad de SAB (Colombatto *et al.*, 2003; Griswold *et al.*, 2003; Qui *et al.*, 2004).

En este sentido conviene también ser cuidadoso, puesto el tipo de filtrado y el material escogido para ello pueden resultar en la inoculación de diferentes fracciones microbianas a las presentes en el fluido ruminal obtenido de los animales. Por ejemplo, el uso de gasa de tamaño de poro de 50 micras reducirá sustancialmente el número de protozoos en el inóculo, porque este grupo presenta tamaños que oscilan entre las 15 y las 200 micras. Los hongos también tienen un tamaño relativamente grande, y se verán perjudicados.

Por otra parte, si no se realiza un tratamiento de desligamiento de las SAB (mayoritariamente celulolíticas) del fluido ruminal antes de utilizarlo, se corre el peligro de eliminarlas del inóculo, y esto podría afectar a los resultados de los experimentos. Sin embargo, algunos de los métodos físicos utilizados para el desligamiento, como el masticador artificial (stomacher) o el procesado con batidoras de varillas (homogeneizado), pueden comprometer la integridad de las células, liberando enzimas endógenos que se añadirían con el inóculo, en lugar de inocular con las células viables completas. 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 SAB 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.

#### 2.2.9.9. Mantenimiento de la anaerobiosis

Es importante mantener las condiciones de anaerobiosis (en la medida de lo posible durante el proceso de inoculación y de forma estricta durante la fermentación) si se quiere optimizar la simulación (Grant y Mertens, 1992).

#### 2.2.9.10. Proporción inóculo: medio de cultivo

Aumentar la proporción de fluido ruminal en el medio de incubación aumentó el volumen (Wood *et al.*, 1988) y la tasa de producción de gas (Pell y Schofield, 1993; Rymer *et al.*, 1999) y redujo el tiempo de latencia (fase *lag*) de los microorganismos ruminales (Pell y Schofield, 1993). Pell y Schofield (1993) recomendaron para BCRM una concentración mínima de inóculo de 20mL/ 100mL de medio de incubación,

reduciendo de esta manera la posibilidad de que una baja cantidad de inóculo limitara la producción de gas.

#### 2.2.9.11. Duración de la incubación

Los experimentos habituales con BCRM suelen tener una duración reducida. Los fermentadores continuos pueden mantenerse durante más tiempo, y suelen mantenerse en funcionamiento durante un mínimo de dos semanas. Van Kessel y Russell (1996) fueron capaces de mantener un cultivo mixto de bacterias ruminales en cultivo continuo durante cuatro meses, pero los metanógenos desaparecieron y *Selenomonas ruminantium* tuvo que ser añadido de forma exógena.

#### 2.2.9.12. Intervalo de medición y presión atmosférica en los BCRM

Lowman *et al.* (1998), utilizando un sistema manual de medida de la presión, permitieron que variara la presión en el espacio de cabeza cambiando el intervalo entre medidas. Aunque la producción de VFA y la proporción de la degradación de la materia orgánica no se vieron afectados por el intervalo de lectura, el perfil de producción de gases sí cambió, de forma que se liberaba menor cantidad de gas cuando los registros se producían cada 6 horas que cuando se efectuaban cada 2 horas. De forma similar, Mauricio *et al.* (1999) observaron una reducción en el volumen de gas producido cuando el intervalo de recogida de datos se incrementaba de 1 a 3 horas, sugiriendo que la presión acumulada en el recipiente de fermentación no afecta a la estequiometría de las reacciones, pero que el volumen de gas que se liberaba era menor cuanto mayor era la presión. Esto es consecuencia, probablemente, de un aumento en la solubilidad del CO<sub>2</sub> al incrementarse la presión en el espacio de cabeza (Mauricio *et al.*, 1999). Pell y Schofield (1993) y Lowman *et al.* (1998) observaron una significativa influencia del intervalo de lectura en la producción de gas.

La presión atmosférica debe tenerse en cuenta a la hora de efectuar los cálculos, y su efecto es especialmente importante cuando se quieren comparar resultados obtenidos en laboratorios situados en diferentes lugares del planeta (a diferente altitud, Theodorou *et al.*, 1994) o cuando los cambios en la presión atmosférica son muy acusados (tormentas, etc) (Rymer *et al.*, 2005).

#### 2.2.9.13. Estratificación en cultivos continuos

Se puede simular la estratificación mediante el enclaustrado del alimento en bolsas de nailon (Czerkawski 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

reproducirlo con resultados más o menos prometedores (Teather y Sauer, 1988; Fuchigami et al., 1989; Muetzel *et al.*, 2009).

#### 2.2.9.14. Agitación

La necesidad de agitar o no el medio de cultivo contenido en los batch y cómo este factor afecta a la fermentación ha sido motivo de controversia. Los resultados de Wilkins (1974) mostraron una ausencia de efecto de la agitación en el tiempo de latencia de los microorganismos, pero este autor observó que los cultivos que se agitaban a 200 oscilaciones por minuto mostraron un marcado incremento en la tasa de gas liberado con relación a los cultivos que permanecían estacionarios. Por el contrario, Pell y Schofield (1993) observaron que el coeficiente de variación entre las medidas de gas de en las muestras agitadas se reducía a la mitad en comparación con aquellas no agitadas. Stevenson *et al.* (1997) no observaron cambios en el patrón de fermentación o en la producción de masa microbiana cuando se agitaba el medio. 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 consistentes entre aparatos, y los datos entre ambos estuvieron bien correlacionados, sugiriendo que agitar el medio tiene relativamente poco efecto en la reproductibilidad de los resultados dentro y entre laboratorios (Rymer *et al.*, 2005). En los CCF existe una agitación mediante palas giratorias, mientras que en los semicontinuos la agitación se realiza mediante el movimiento vertical de ascenso y descenso de las bolsas de nailon que contienen el alimento.

#### 2.2.9.15. Tamaño de muestra y tamaño de partícula en los BCRM

Algunos autores han observado incrementos de la digestibilidad *in vitro* al disminuir el tamaño al que se molían las muestras (Cone *et al.*, 1989). En este sentido, el tipo de malla utilizada para moler el alimento puede afectar también (Richards *et al.*, 1995).

El tamaño de la muestra utilizada por los diferentes grupos para los BCRM puede variar desde 40 a 1250 mg. El pequeño tamaño de muestra utilizado por algunos autores (Pell y Schofield, 1993) puede hacer el sistema más propenso a errores experimentales cuando se pesan muestras heterogéneas. Sin embargo, cuando se utilizan muestras más grandes, es esencial que el sistema sea capaz de tamponar la acidez producida durante la fermentación, y que la presión acumulada no sea tan alta que afecte al perfil de producción de gases. Por ello, es necesario encontrar una solución intermedia de conveniencia para la cantidad de alimento a fermentar.

Con los alimentos fibrosos o lentamente degradables, la tasa de producción de gas se incrementa a medida que disminuye el tamaño de partícula (Menke y Steingass, 1988; Lowman *et al.*, 2002), y parece probable que esto sea consecuencia del aumento de superficie (como resultado de la molienda) que permite un mayor y mejor acceso microbiano al alimento, y por tanto mayor fermentación. Sin embargo, esto representa un problema cuando se utilizan las IVGPT para predecir las cinéticas de degradación, debido a que en el aparato digestivo del animal las partículas de sustrato cambian continuamente de forma, tamaño y composición (Lowman *et al.*, 2002). La adopción de una estandarización en la preparación de las muestras podría permitir la comparación entre los datos de producción de gas generados independientemente por diferentes laboratorios, aunque hay autores (Lowman *et al.*, 2002) que opinan que debido a este problema parece poco probable que el perfil de producción de gases pueda representar de forma fidedigna la cinética de digestión de la masa vegetal en el rumen o en el tracto digestivo posterior de los animales monogástricos, aunque en estos últimos no existan procesos de rumia que modifiquen más la naturaleza del alimento.

#### 2.2.9.16. Tasa de dilución y tiempo de retención

La tasa de dilución (DL) y el tiempo de retención (RT) del sólido afectan a la fermentación ruminal y el crecimiento microbiano, aunque los resultados en la bibliografía son controvertidos. Mientras algunos estudios han indicado mayor producción de VFA y crecimiento microbiano al aumentarse la DL (Stern y Hoover, 1979; Meng *et al.*, 1999), y al disminuir el tiempo de retención del sólido (SRT) (Hoover *et al.*, 1982; Shriver *et al.*, 1986; Schadt *et al.*, 1999) otros autores no han encontrado efectos en la producción de VFA (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 factores como el ambiente, el estado fisiológico del animal, las características de la dieta, el nivel de ingestión y la especie, entre otros (Colucci *et al.*, 1990; Stern *et al.*, 2006). La DL y el RT del sólido afectan a la fermentación ruminal, a la digestibilidad del alimento y a las comunidades bacterianas y protozoarias, entre otros, 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). Por lo tanto, es necesario determinar qué efectos tienen, *per se*, los cambios en el tiempo de retención del sólido y la tasa de dilución sobre la fermentación y la eficiencia de

síntesis microbiana, de forma que puedan ser manipulados para conseguir una síntesis microbiana óptima. Dadas las dificultades para evaluar la influencia de estos factores *in vivo*, la mayor parte de los datos disponibles provienen de experimentos *in vitro* llevados a cabo con fermentadores artificiales, y las discrepancias entre estudios pueden ser debidas a numerosos factores, entre ellos las dietas incubadas, el tipo de fermentador y las características del inóculo.

La mayor parte estudios realizados hasta el momento con cultivos puros o mixtos de bacterias ruminales han indicado que al aumentar la DL, disminuir el SRT o combinando ambos factores se incrementa el crecimiento de los microorganismos y la eficiencia de síntesis microbiana (Isaacson *et al.*, 1975; Stern y Hoover, 1979; Crawford *et al.*, 1980; Shriver *et al.*, 1986; Meng *et al.*, 1999; Schadt *et al.*, 1999; Eun *et al.*, 2004). Sin embargo, Hoover *et al.* (1984) encontraron el efecto contrario a bajas tasas de dilución. Hoover *et al.* (1982) detectaron también ausencia de efecto sobre la eficiencia de síntesis microbiana al aumentar el SRT, pero Schadt *et al.* (1999) observaron un descenso. Es necesario ser cauteloso a la hora de comparar los resultados dado que en estos trabajos se observan diferentes oscilaciones del pH, además de utilizarse diferentes tipos de fermentadores y distintas dietas, SRT y DL.

En los experimentos *in vitro*, la forma habitual de conseguir mayores tasas de dilución es incrementar el volumen de saliva artificial o solución tampón que entra en el sistema por unidad de tiempo. Al aumentarse de esta forma la capacidad amortiguadora en el sistema, el pH aumenta. Hoover en 1984 apuntó que a tiempo de retención constante, el efecto del pH podría ser más importante que el de la DL en el control de la digestión ruminal, pero en este tipo de estudios los efectos de la DL y del pH en la fermentación y la síntesis de proteína microbiana no pueden separarse. En este sentido, incrementar la DL manteniendo un valor fijo de pH puede ayudar a discernir los efectos de este último factor.

Además, 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 un aumento en la DL redundaría en una disminución del SRT, haciendo también difícil separar los efectos de ambos factores.

Los fermentadores de flujo continuo doble (Hoover *et al.*, 1984, Schadt *et al.*, 1999) permiten un control más preciso porque ambas fracciones abandonan el sistema a diferente velocidad, y en sistemas de flujo semicontinuo como el Rusitec, el control es

aún mayor, dado que la fracción sólida abandona el sistema de forma fija, manualmente, a tiempos prefijados y por ello el SRT no se ve afectado por la DL. Sin embargo, en fermentadores Rusitec habitualmente la dieta se incuba durante 48 horas, pero *in vivo* el RT del concentrado es menor que el de los alimentos más fibrosos (Mambrini y Peryaud, 1997). En experimentos *in vivo* (Mambrini y Peryaud, 1997) se ha determinado que el concentrado tiene un menor tiempo de retención en el rumen que las partículas de forraje, pero en el manejo habitual de Rusitec todos los alimentos permanecen 48 horas dentro de los fermentadores. Estudios previos (Ranilla *et al.*, 2001a) han demostrado que la simulación de la fermentación en fermentadores Rusitec alimentados con dietas altas en concentrado es a menudo insatisfactoria. Dado que el tiempo de retención de la digesta sólida en el rumen es uno de los factores que afectan a la fermentación ruminal *in vivo*, puede resultar interesante investigar el efecto de diferentes tiempos de retención del concentrado en los parámetros de fermentación en fermentadores Rusitec. La disminución del tiempo de retención del concentrado previsiblemente incrementará su digestibilidad y puede producir modificaciones en el perfil de VFA, aproximándose a los valores encontrados *in vivo*. Algunos autores han reportado mayor desaparición de la materia seca, NDF y ADF al aumentar la DL (Crawford *et al.*, 1980; Eun *et al.*, 2004; Fondevila y Pérez-Espés, 2008) mientras otros no observaron este efecto (Czerkawski y Breckenridge, 1977; Carro *et al.*, 1995). Un mayor RT previsiblemente redundará en una mayor desaparición aparente de la materia seca, NDF y ADF como ha sido demostrado por varios autores (Crawford *et al.*, 1980; Shriver *et al.*, 1986; Schadt *et al.*, 1999). Mientras algunos autores afirman que la producción de VFA y el crecimiento microbiano pueden incrementarse al aumentar la DL (Stern y Hoover, 1979; Meng *et al.*, 1999) y al disminuir el SRT (Hoover *et al.*, 1982; Shriver *et al.*, 1986; Schadt *et al.*, 1999), otros no han encontrado efectos en estos parámetros (Isaacson *et al.*, 1975; Hoover *et al.*, 1984; Eun *et al.*, 2004). La producción y el perfil de VFA también se ven afectados por el SRT y la DL, con efectos variables dependiendo de los diferentes trabajos. Stern y Hoover (1979) y Crawford *et al.* (1980) encontraron que una alta DL incrementaba la producción total de VFA, mientras que otros encuentran que este parámetro no afecta a la producción de VFA (Isaacson *et al.*, 1995; Hoover *et al.*, 1984; Eun *et al.*, 2004) o la hace disminuir (Carro *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 1999). La proporción molar de propiónico aumentó (Isaacson *et al.*, 1995; Carro *et al.*, 1995), se mantuvo sin cambios (Eun *et al.*, 2004; Fondevila y Pérez-Espés, 2008) o disminuyó (Crawford, 1980) al aumentar la DL. Las proporciones de butírico



pueden disminuir al aumentar la DL (Carro *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 1999; Eun *et al.*, 2004), aunque esto puede variar dependiendo del tipo de dieta (Meng *et al.*, 1999). Eun *et al.* observaron mayores proporciones de valérico e isovalérico al aumentar la DL, lo que podría estar relacionado con una mayor actividad proteolítica. En experimentos con Rusitec ha sido común observar relaciones no fisiológicas entre Ac:Pr y concentraciones anormalmente elevadas de caproico que no aparecen *in vivo* cuando los fermentadores recibían dietas concentradas (Gómez *et al.*, 2005, Carro *et al.*, 2009), hecho que se ha atribuido a que el concentrado permanece 48 horas dentro del fermentador y a DL bajas que fomentan una mayor acumulación de productos finales. En lo referente a la producción de metano, los resultados también son contradictorios. Mientras que Isaacson *et al.* (1975) encontraron un descenso en la producción de este gas al aumentar la DL, Eun *et al.* (2004) observaron el fenómeno contrario, es decir, mayores DL produjeron mayor producción de CH<sub>4</sub>, probablemente como efecto concomitante al descenso del pH, dado que la producción de este gas está fuertemente afectada por este factor, declinando mucho con pH inferiores a 6,3 (Russell, 1998); al mantener un pH constante, este efecto se puede obviar. Además, se sabe también que las arqueas metanogénicas ven reducidas sus comunidades a altas DL (Eun *et al.*, 2004). El CH<sub>4</sub> se produce cuando se forman acético y butírico (Wolin, 1960); si se disminuye el SRT y ello conlleva un aumento en la producción de metano, esto puede asociarse a un incremento en la proporción de acético y un descenso en el propiónico (Crawford *et al.*, 1980; Schadt *et al.*, 1999), lo que podría ser un reflejo de la menor cantidad de fibra digerida cuando el SRT es menor. Schadt *et al.* (1999) observaron que aumentando el SRT en cultivos continuos se incrementó la digestión de la fibra y la materia seca, pero la digestión de la proteína no se vio afectada. El secuestro de los protozoos entre la masa sólida de la digesta es un fenómeno bien conocido y documentado (Nakamura y Kurihara, 1978), y en este sentido una reducción en el SRT en fermentadores continuos conlleva un marcado descenso de las comunidades protozoarias (Crawford *et al.*, 1980).

#### 2.2.9.17. Mantenimiento de los protozoos

Una de las mayores diferencias en la ecología microbiana entre el rumen y los cultivos continuos es el acusado descenso (o la desaparición) de los protozoos que habitualmente se produce en los fermentadores (Rufener *et al.*, 1963; Slyter y Putnam 1967; Abe y Kumeno, 1973; Hoover *et al.*, 1976a; Nakamura y Kurihara, 1978;

Crawford *et al.*, 1980; Hino *et al.*, 1993; Carro *et al.*, 1995; Mansfield *et al.*, 1995; Moumen *et al.*, 2007; Muetzel *et al.*, 2009).

Los requerimientos para una fermentación *in vitro* en la que se mantenga una comunidad protozoaria en estado estacionario deben incluir una forma física de retener el sólido dentro del fermentador, que permita el secuestro de los protozoos en la trama sólida de la digesta, y tasas de renovación de líquidos y sólidos que permitan la permanencia de este grupo pero que no comprometan la retirada efectiva de los metabolitos. La desaparición de los protozoos se debe probablemente a su lenta velocidad de crecimiento (Czerkwaski y Breckenridge, 1977; Mansfield *et al.*, 1995) y a la exposición de los fermentadores al oxígeno (Hillman *et al.*, 1991; Abe e Iriki, 1978; Hillman *et al.*, 1991; Mansfield *et al.*, 1995).

La cantidad de alimento, los cambios en la relación forraje:concentrado y la calidad del forraje afectan *in vivo* (Abe *et al.*, 1973; Dijkstra y Tamminga, 1995), e *in vitro* (Nakamura y Kurihara, 1978) a las comunidades protozoarias. Sin embargo, los estudios sobre cómo afectan estos factores en cultivos semicontinuos son escasos.

La respuesta a factores como el aumento en los niveles de concentrado puede depender de la calidad del forraje (Matejovsky y Sanson, 1995). Dehority y Mattos (1978) vieron que una especie del género *Holotricha* disminuyó mucho cuando se añadió concentrado a la ración de un animal que se alimentaba de pastos. Orpin y Letcher (1978) apuntaron que los *Isotricha* se adhieren a las partículas de alimento. También se ha visto que los holotricos aparecen en mayor cantidad en los animales que reciben heno o forrajes ricos en azúcares solubles (Warner, 1965; Hungate, 1966). Eadie (1962) observó que los *Entodinium* permanecían en el rumen de terneros y corderos a pH 6,0, mientras que los holotricos no se desarrollaban a pH por debajo de 6,5. Carro *et al.* (1995) vieron que los holotricos representaron el 1,35% del total de protozoos en Rusitec alimentados con dietas elevadas en forraje a pH 6,36, pero desaparecieron totalmente a pH 6,17. Carro *et al.* (1992) observaron que este grupo constituyó el 12,2% del total de protozoos en Rusitec con la misma dieta a pH 6,86. Abe *et al.* (1972) vieron que en el rumen, el aumento en la cantidad de concentrado aumentó los entodiniomorfos, independientemente de la calidad del forraje. Los entodiniomorfos, excepto algunas especies de *Entodinium* de pequeño tamaño, utilizan almidón (Warner, 1965; Abe *et al.*, 1972), y son abundantes en el rumen de animales que reciben dietas muy concentradas (Hungate, 1966). Con estas dietas los Diplodiniinae reducen mucho

sus comunidades y pueden llegar a desaparecer (Franzolin y Dehority, 1996). Los Entodiniinae son los únicos protozoos capaces de mantenerse en fermentadores continuos (fundamentalmente de flujo semicontinuo) a lo largo del tiempo (Slyter y Putnam, 1967; Carro *et al.*, 1992, 1995). Este grupo puede estar menos afectado por factores referentes a la dieta o al pH, debido a su corto tiempo de generación y a su capacidad para utilizar almidón. De hecho, se sabe que son los más abundantes en el rumen de animales que reciben dietas de elevado contenido en concentrados (Williams y Coleman, 1992; Franzolin y Dehority, 1996; Hristov *et al.*, 2001). Los Diplodiniinae, sin embargo, son más sensibles al pH ácido y desaparecen del rumen cuando este valor desciende (Franzolin y Dehority, 1996; Goad *et al.*, 1998; Hristov *et al.*, 2001). Los Ophryoscolecinae poseen largos tiempos de generación, de más de 24 horas hasta 2-3 días (Sylvester *et al.*, 2009). Además, su tamaño es grande (hasta 200 micras, Williams *et al.*, 1961). Ambos factores pueden afectar a su supervivencia en los fermentadores debido a que no les da tiempo a reproducirse y también a que el tamaño de poro de la bolsa de nailon utilizada habitualmente en el Rusitec (100 micras) no les permite moverse y van siendo eliminados cada vez que se cambia la bolsa, hecho que fue sugerido hace años por Meyer y Mackie (1986).

*In vivo*, dietas que contengan de un 40 a un 60% de concentrado propiciarán las máximas cifras de protozoos con una fauna diversa que contenga especies de todos los géneros (Dehority y Orpin, 1988; Towne *et al.*, 1988), mientras que si hay mucho concentrado estas cifras disminuirán mucho, llegando incluso a defaunarse el sistema (Jouany, 1989). Incluso cantidades tan pequeñas como un 10% de forraje tendrán un efecto positivo en el mantenimiento de los protozoos *in vivo* (Kreikemeier *et al.*, 1990). Nakamura y Kanegasaki (1969) vieron que en general hay más Isotrichidae en dietas concentradas y más Ophryoscolecidae en dietas basadas solo en heno. Hristov *et al.* (2001) vieron que *in vivo*, los únicos protozoos que sobrevivieron en el rumen cuando los animales recibían dietas muy concentradas fueron especies del género *Entodinium*.

Sin embargo, Towne *et al.* (1990) observaron que los protozoos eran abundantes en el rumen del ganado alimentado *ad libitum* con dietas muy concentradas que propiciaban la disminución del pH ruminal. Bauchop y Clarke (1976) dijeron que los entodiniomorfos se ligan a las fibras vegetales dañadas. Algunos grupos de protozoos predan sobre otros; si desaparecen algunos grupos, sus predadores también pueden verse

reducidos (Eadie, 1967). Otro factor que puede afectar es el tamaño de partícula que reciben los fermentadores y la manipulación del sistema.

Los holotricos son el grupo de protozoos más vulnerable debido a su elevado tiempo de generación (Williams, 1986). En general, en los sistemas de cultivo continuo, se necesitan altas tasas de dilución para retirar de forma eficaz los productos finales de la fermentación. Estas altas velocidades de flujo conducen a la eliminación de los protozoos por “lavado”. Si se desea que los protozoos ligados a las partículas sólidas permanezcan en el fermentador durante más tiempo, la fase sólida ha de tener una tasa de renovación más baja que la líquida, como ocurre de forma natural en el rumen. En este sentido, los fermentadores semicontinuos como el Rusitec podrían ser más adecuados en el mantenimiento de los protozoos que los sistemas de flujo continuo, dado que el sustrato sólido está contenido en bolsas de nailon en lugar de estar libre en el medio de incubación y sometido a agitación.

En sistemas de flujo continuo se han realizado varios intentos para retener a los protozoos: bajo suministro de sustrato, baja tasa de renovación o uso de matrices de retención. Si las velocidades de dilución son inferiores al volumen del fermentador diariamente, pueden desaparecer los protozoos debido a que no les da tiempo a reproducirse y al incremento de concentración de productos finales, con el descenso del pH (Abe y Kumeno, 1973; Hoover *et al.*, 1976a; Czerkawski y Breckenridge, 1977; Crawford *et al.*, 1980). Abe y Kumeno (1973) en un sistema en el que los productos finales de la fermentación se eliminaban por diálisis, mantuvieron las comunidades protozoarias en sus niveles originales durante 4 días con una DL de 0,5 volúmenes/día, pero esta tasa no es representativa de las condiciones *in vivo*. El aumento en la velocidad de dilución hasta 1,2 volúmenes/día produjo un descenso gradual en el número de protozoos, y además esta DL seguía contrastando con las condiciones *in vivo*, donde la velocidad de renovación del líquido supera los 1,5 volúmenes /día (Hungate, 1966). Ziemer *et al* (2000) obtuvieron descensos aún mayores cuando aumentaron la DL a 2 volúmenes por día.

Weller y Pilgrim (1974) fueron capaces de mantener el número de protozoos en un aparato de cultivo continuo diseñado para retardar el flujo de la digesta sólida. A pesar de todo, los sistemas en los que se ha conseguido mantener el número de protozoos tienen inconvenientes, sobre todo, para los estudios de rutina en cultivo continuo (Hoover *et al.*, 1976a). Martín-García (2001) sugiere que los resultados obtenidos con

fermentadores en los que han sido lavados los protozoos podrían compararse con los obtenidos en animales defaunados.

Reducir la agitación y permitir la estratificación puede ser la técnica más prometedora para retener protozoos en fermentadores de flujo continuo (Teather y Sauer, 1988; Fuchigami *et al.*, 1989; Hino *et al.*, 1993). Teather y Sauer (1988) y Fuchigami *et al.* (1989) propusieron sistemas en los que los protozoos se retuvieron durante 17 y 26 días respectivamente. Teather y Sauer (1988) e Hino *et al.* (1993) diseñaron un sistema que permite una estratificación del contenido del fermentador de manera similar a lo que ocurre *in vivo*, recogiendo el efluente desde el centro de este. En este sistema, el material que abandona el sistema es “seleccionado” por gravedad (las partículas que han sido suficientemente digeridas tienden a salir del sistema, tal y como ocurre en el rumen), aunque Czerkawski (1986) apuntó que esto supone una pérdida de control sobre el sistema. Además, se obstruía con relativa facilidad, especialmente cuando se incubaban sustratos ricos en fibra. Muetzel *et al.* (2009) han propuesto un sistema basado en el de Teather y Sauer (1988) con diferentes flujos y un sistema de dispensación del alimento diferente (consiguiendo así concentraciones más constantes de materia seca en el fermentador y el efluente y previniendo los atascos), y encontraron razonables parecidos entre *in vivo* e *in vitro*, aunque con más bajas concentraciones de VFA, rRNA y actividades enzimáticas totales en los fermentadores.

La supervivencia de los protozoos también está influenciada por la frecuencia de alimentación. Teather y Sauer (1988) mostraron que alimentar dos veces al día a los fermentadores lleva a un descenso de los protozoos, mientras que si reciben la comida de forma continua se mantienen las comunidades activas.

Muetzel *et al.* (2009) vieron que el descenso de los protozoos en los sistemas *in vitro* era mayor o menor dependiendo del inóculo, dado que la variabilidad entre animales es muy importante. El descenso de los protozoos puede resultar en un aumento de las comunidades bacterianas o arqueas metanogénicas (Ushida *et al.*, 1990; Jouany, 1996; Koenig *et al.*, 2000) o no (Muetzel *et al.*, 2009).

#### 2.2.9.18. Adaptación del sistema

Pese al extendido uso de los fermentadores Rusitec, no existe aún una estandarización en lo referente a las condiciones de manejo del sistema como pueden ser el periodo de adaptación, la tasa de dilución de la fase líquida o la cantidad de

alimento suministrada (Boguhn *et al.*, 2008; Carro *et al.*, 2009). Cuando se inocula un sistema de cultivo continuo, los microorganismos ruminales tienen que adaptarse a las nuevas condiciones que imperan en el sistema *in vitro*. Es sabido que a lo largo del periodo de incubación, y especialmente en sus primeros días, se producen modificaciones en las comunidades microbianas relacionadas con esta adaptación (Slyter y Putnam, 1967; Prevot *et al.*, 1994). Czerkawski y Breckenridge (1977, 1979a) indicaron que cuando el Rusitec recibe dietas equilibradas, el sistema logra alcanzar el estado estacionario en 4 a 6 días, mientras que si la dieta era de baja calidad este periodo aumentaba. En la bibliografía se observa cómo los diferentes autores han utilizado periodos de adaptación muy variables, que van 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).

También 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 alcanzar el estado estacionario, entendiendo este como aquel momento en el que la salida diaria de productos de fermentación (VFA, NH<sub>3</sub> y láctico) no varía de forma significativa a lo largo de los días.

#### 2.2.9.19. Desligamiento

En la mayor parte de los estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, los microorganismos se han aislado a partir de la fase líquida, mediante filtración y centrifugación diferencial. Sin embargo, la estructura de las comunidades microbianas en la fase líquida es diferente de aquellas asociadas a la fase sólida (Cheng y McAllister 1997; Strobel *et al.*, 2008). Las BAS pueden representar hasta un 90% del total de los microorganismos ruminales (Merry y McAllan, 1983; Faichney, 1980). Una forma de obtener una muestra microbiana representativa es aislar las dos fracciones por separado, mediante diferentes procedimientos de desligamiento.

Como se ha visto, uno de los métodos utilizados para estimar la síntesis microbiana tanto *in vivo* como *in vitro* es el uso de marcadores microbianos de diferentes tipos, relacionando el marcador (sea externo o interno) con el contenido en N de los microorganismos. Es un hecho conocido que las BAS y las BAL presentan diferencias en su relación marcador: N (Merry y McAllan, 1983; Broderick y Merchen, 1992; Carro, 2001; Carro y Miller, 2002; Molina-Alcaide *et al.*, 2008). Sin embargo, tradicionalmente este tipo de estudios se han realizado utilizando las BAL, dada la

relativa facilidad para su aislamiento. Hay que tener en cuenta que las SAB permanecen íntimamente asociadas con las partículas del alimento, hecho que dificulta su estudio y la estimación de la fracción microbiana correspondiente a este compartimento. Sin embargo, las SAB pueden llegar a suponer más del 70% de la masa microbiana que abandona el rumen (Yang *et al.*, 2001; Ipharragerre *et al.*, 2007) y por lo tanto, si se quiere estimar la síntesis de proteína microbiana de forma veraz, es imprescindible tener en cuenta a las SAB.

Para ello, comúnmente se emplean diferentes técnicas para desligar las SAB de las partículas de alimento. El método elegido para el desligamiento puede afectar a la integridad microbiana o a la composición de los pellets de SAB aislados. Esto influirá eventualmente en la relación marcador: N y por tanto en la estimación de la síntesis de proteína microbiana. Los métodos de desligamiento pueden ser físicos (stomacher, homogeneización, frío) (Minato y Suto, 1978; Martín-Orue *et al.*, 1998; Trabalza-Marinucci *et al.*, 2005), químicos (empleando sustancias como NaCl, tween 80, butanol terciario o formaldehído) (Martín-Orue *et al.*, 1998) o una mezcla de ambos, como en el caso de la metilcelulosa, que “compite” con el sustrato dado que bajo determinadas condiciones las bacterias tienden a desligarse de la fibra y unirse a este compuesto. Este método ha demostrado ser uno de los más eficaces (Ranilla y Carro, 2003).

Cuando se realiza un tratamiento de desligamiento hay varios factores a tener en cuenta. Primero, qué eficiencia de desligamiento se ha conseguido, es decir, cuántas SAB hemos conseguido desligar del material particulado. En la literatura se pueden encontrar eficiencias de desligamiento que van desde el 20 hasta el 90% (Legay-Carmier y Bauchart, 1989; Olobokun y Craig, 1990; Whitehouse *et al.*, 1994; Ranilla y Carro, 2003; Trabalza-Marinucci *et al.*, 2005).

Otro aspecto importante es la posterior recuperación de esos microorganismos que hemos desligado. Hay que tener en cuenta que si lo que hemos desligado no es representativo de las SAB que había en origen (en el rumen o en la digesta sólida del fermentador), estaremos cometiendo errores a la hora de estimar el crecimiento microbiano. En este sentido, los resultados obtenidos hasta el momento resultan poco alentadores, puesto que la eficiencia de recuperación de los microorganismos desligados nunca es mayor del 55%.

Cada comunidad posee sus propias características físico-químicas y sus propios mecanismos de adhesión al sustrato. Debido a ello, varios autores han sugerido que la eficiencia del desligamiento puede estar influida por la naturaleza del sustrato

(Olobobokun y Craig, 1990; Ranilla y Carro, 2003). Las partículas de forraje, al ser de mayor tamaño que las del concentrado, podrían arrojar mayores eficiencias de desligamiento (Legay-Carmier y Bauchart, 1989). En este sentido, los fermentadores Rusitec permiten incubar por separado el alimento fibroso y el concentrado, facilitando así la realización del tratamiento de desligamiento en ambas fracciones.

Otro factor que puede afectar al proceso de desligamiento es el momento en el que se realiza el muestreo. Varios autores han indicado que el grado de adhesión microbiana al sustrato puede ser mayor en las primeras horas de incubación que en horas posteriores (Leedle *et al.*, 1982; Craig *et al.*, 1987b; Olobobokun y Craig, 1990).

En la actualidad, las técnicas moleculares emergen como una herramienta muy valiosa a la hora de comparar de forma directa las SAB originales y las obtenidos y recuperadas tras el procedimiento de desligamiento.

#### **2.2.10. Alternativas al inóculo obtenido a través de cánulas ruminales**

Con el fin de reducir la utilización de animales fistulados para obtener el inóculo en los estudios *in vitro* se han sugerido alternativas como el uso de heces, pues algunos estudios han indicado que el inóculo fecal tiene potencial para reemplazar al ruminal (El Shaer *et al.*, 1987; Jones y Barnes, 1996; Macheboeuf y Jestin, 1997; Mauricio *et al.*, 1997; Omed *et al.*, 2000; Dhanoa *et al.*, 2004). Sin embargo, este presenta problemas como la variabilidad en la composición de las heces o las dificultades de su utilización por parte de los diferentes grupos de trabajo.

La extracción del fluido ruminal via esófago a través de una sonda es otra opción, pero en este caso las muestras a menudo se contaminan con la saliva y se somete a un estrés considerable al animal. Además, las muestras obtenidas por esta vía pueden no ser representativas del conjunto del contenido del rumen, debido a la dificultad de control del movimiento de la sonda una vez que está dentro de este. También se puede optar por el sacrificio, extrayendo el contenido del rumen una vez muerto el animal, alternativa que por razones prácticas no ha sido muy utilizada, aunque en ocasiones se recurre a animales sacrificados en el matadero.

Barbi *et al.* (1993) investigaron el uso de efluente de un fermentador semicontinuo (Rusitec) como sustituto del fluido ruminal para utilizarlo como inóculo de cultivos no renovados, observando que la actividad microbiana del efluente fue mucho menor que la observada para el fluido ruminal. Estos mismos autores intentaron incrementar esta actividad aumentando el aporte y disminuyendo el tamaño de partícula del alimento que introducían en el Rusitec, sin conseguir resultados aparentes.



Otra forma de determinar *in vitro* la degradabilidad de un sustrato sin utilizar animales fistulados como donantes de inóculo son los ensayos de digestibilidad enzimática mediante enzimas comerciales procedentes de diferentes cepas bacterianas (Jones y Hayward, 1975; Dowman y Collins, 1982; De Boever *et al.*, 1986; Jones y Theodorou, 2000). Con este método se han estimado las digestibilidades de los carbohidratos y las proteínas en el rumen. Sin embargo, este método es poco sensible a factores como los efectos asociativos y las toxinas que pueden afectar a la degradación microbiana, y los resultados obtenidos no han sido convenientemente validados con valores obtenidos *in vivo* (Getachew 1998). La validez biológica de los resultados puede además verse limitada como resultado de una actividad incompleta en comparación con la existente en el medio ruminal (Mahadevan *et al.*, 1987).

A modo de resumen, podemos esquematizar las ventajas y las limitaciones de los métodos *in vitro* para simular la fermentación ruminal en unas pocas líneas:

Ventajas generales de los métodos *in vitro*:

- Reducen uso animales canulados.
- Reducen la elevada variabilidad inherente a los animales.
- Permiten un mejor control de las condiciones y permiten amplios rangos de variación.
- Reducen los costos (cantidad de alimento o aditivo) y el tiempo de trabajo (manejo relativamente sencillo en comparación con los animales).
- Permiten realizar experimentos que difícilmente se podrían realizar *in vivo* (probar sustancias tóxicas o en concentraciones muy elevadas que serían mortales para los animales, trabajar con isótopos radiactivos, etc).

Limitaciones generales de los métodos *in vitro*:

- Dificultad de simular factores como la absorción a través de las paredes del rumen, la eliminación selectiva de los productos de fermentación, o las tasas variables de pasaje del alimento y el líquido.
- Problemas relacionados con la recogida de los flujos líquido y gaseoso.
- Desaparición o disminución de los protozoos (defaunación).
- Imposibilidad de trabajar con los altos contenidos de MS del rumen.

- Pueden existir interacciones entre hospedador y microorganismos que aún no han sido descritas.

## **2.3. Comparación *in vivo-in vitro***

### **2.3.1 Qué se ha hecho hasta el momento**

Es lógico pensar que un sistema de fermentación artificial no puede imitar la fermentación ruminal *in vivo* en todos sus aspectos (Muetzel *et al.*, 2009), pero se puede intentar perfeccionar su capacidad para la simulación cada vez más. Parece claro que este perfeccionamiento pasa por la reproducción fidedigna de los factores ambientales que *in vivo* afectan a las comunidades microbianas del rumen.

Para validar un sistema 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). La mayor parte de los estudios *in vitro* se han centrado en el estudio de los parámetros de la fermentación ruminal o de las comunidades microbianas establecidas en los fermentadores (Slyter y Putnam, 1967; Hannah *et al.*, 1986; Ziemer *et al.*, 2000), y se ha visto que existen diferencias importantes entre la microbiota ruminal y la que se establece en los fermentadores, lo cual podría explicar algunas de las dificultades de los sistemas *in vitro* para simular la fermentación.

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 estos trabajos son los de Slyter y Putnam (1967), Hannah *et al.*, (1986), Mansfield *et al.*, (1995), Ziemer *et al.*, (2000), Devant *et al.*, (2001), Yang *et al.*, (2004), Rotger *et al.*, (2006); Moumen *et al.*, (2008), Carro *et al.*, (2009) o Muetzel *et al.*, (2009).

Si bien en un principio la simulación de la fermentación no era ideal (y sigue sin serlo), a medida que se ha avanzado y perfeccionado los sistemas se han obtenido resultados cada vez más prometedores. Sin embargo, a veces se observan diferencias en los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* (Yang *et al.*, 2004; Carro *et al.*, 2009, entre otros), y estas diferencias se han atribuido a factores que son difíciles de reproducir y que ya han sido mencionados, como el pH, el RT, la DL, la estratificación, la producción de saliva, la absorción de productos finales, el mantenimiento de los protozoos, el reciclado de la urea, factores relacionados con el inóculo, etc. Esto dificulta la comparación directa de resultados de diferentes experimentos (Huntington y Givens, 1995).

Blake y Stern (1988) encontraron, en fermentadores, eficiencias de síntesis de proteína microbiana semejantes a las obtenidas *in vivo* por Santos *et al.* (1984) y Stern

*et al.*, (1985). Mansfield *et al.* (1995) afirmaron que los valores de digestión de la materia orgánica y de la materia seca obtenidos mediante cultivo continuo, eran similares a los valores obtenidos *in vivo*. Los resultados de Hannan *et al.* (1986) ratifican esta afirmación y añaden que también los valores de degradabilidad de la proteína y de los aminoácidos obtenidos en fermentadores e *in vivo* eran comparables.

En los fermentadores no se produce absorción de los VFA generados durante los procesos fermentativos. Debido a esto, se pueden encontrar diferentes concentraciones *in vitro* comparativamente a las halladas *in vivo* (Mansfield *et al.*, 1995). Las eficiencias de producción de VFA obtenidas *in vitro* por Satter y Slyter (1974) son del mismo orden que las obtenidas *in vivo* por Esdale *et al.* (1968). Sin embargo, los resultados de Hannah *et al.* (1986) indicaron que las proporciones de acético obtenidas en cultivo continuo e *in vivo* eran similares, y otros autores (Slyter y Putnam, 1967; Mansfield *et al.*, 1995; Devant *et al.*, 2001) encontraron que la concentración de VFA era mayor en los cultivos continuos que *in vivo*, debido a esta falta de absorción de VFA a través de las paredes del rumen. Ello se traduce en una menor eficiencia de producción de VFA *in vitro*. Slyter y Putnam (1967) postularon que la diferencia en VFA puede ser también debida a la disminución de protozoos *in vitro* o a las diferencias en las comunidades microbianas *in vivo* e *in vitro*. El acúmulo de ácidos orgánicos conlleva una disminución del pH en los fermentadores así como incrementos en la presión osmótica, y esto puede conllevar un aumento de los requerimientos energéticos de las comunidades microbianas (Mansfield *et al.*, 1995).

Asimismo, existen factores como el reciclado de la urea o el aporte de N endógeno que no pueden ser reproducidos *in vitro*, lo cual puede ser causa de fallos en la simulación del metabolismo nitrogenado (Meng *et al.*, 1999; Tapia *et al.*, 2002; Rotger *et al.*, 2006; Moumen *et al.*, 2008). Cuando se ha intentado incorporar estos factores a la simulación, no se han conseguido resultados satisfactorios (Hannah *et al.*, 1986).

Prevot *et al.* (1994) evaluaron el sistema Rusitec y encontraron que no puede reproducir la situación habitual de los animales *in vivo* y dicen que ciertas variables en este tipo de fermentadores deben ser estudiadas y modificadas. Mansfield *et al.* (1995) compararon un CCF de flujo doble con el rumen de vacas lecheras. No encontraron diferencias en la materia orgánica verdaderamente digerida, pero la digestión de los carbohidratos no estructurales fue mayor y la de la NDF fue menor en los fermentadores, en paralelo con un aumento de las bacterias amilolíticas y un descenso en las celulolíticas. Sin embargo, encontraron un 80% de parecido entre los resultados

*in vivo* e *in vitro*, sugiriendo que los CCF son un buen modelo para estudiar la fermentación ruminal.

Gizzi *et al* (1998) mantuvieron comunidades de bacterias y protozoos similares a las encontradas *in vivo* durante todo el periodo de incubación (un máximo de 24 horas), y observaron las mismas variaciones diurnas de las comunidades que se dan de forma natural en el rumen (Dehority y Orpin, 1997; Leedle y Greening, 1988). Las cantidades de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en este trabajo fueron óptimas para la fermentación y el NH<sub>3</sub> nunca se acumuló hasta extremos tóxicos, presentando un ciclo típico similar al observado *in vivo*, probablemente como resultado de la utilización activa del NH<sub>3</sub> para la síntesis de proteína microbiana. Esto confirmó el correcto desarrollo de los procesos de fermentación. La digestibilidad de la materia orgánica también mostró tendencias similares *in vivo* e *in vitro*, excepto para la fracción inmediatamente soluble (la representada por el alimento degradado a las 0h: cantidad de materia seca solubilizada después de lavar las bolsas de nailon sin que se hayan sometido a ningún proceso de fermentación) y las diferencias observadas se debieron a las diferentes características de las bolsas utilizadas *in vivo* e *in vitro*.

En fermentadores, las concentraciones de NH<sub>3</sub> son el resultado de la utilización y liberación del mismo por la comunidad microbiana. Mansfield *et al.*, (1995) observaron concentraciones de NH<sub>3</sub> menores en los fermentadores que *in vivo*, pero postularon que la ausencia de absorción de este nutriente en los cultivos continuos y las posibles diferencias en el reciclado del N hacen de la medida de concentración de NH<sub>3</sub> un mal indicador comparativo entre la actividad proteolítica y de la degradación de proteína en los sistemas *in vitro* e *in vivo*. Bach *et al.* (1999) ratificaron este hecho y lo atribuyeron a la pérdida de protozoos o a la menor degradación de la proteína *in vitro*.

También se ha observado una influencia del tiempo de retención del alimento (Crawford *et al.*, 1980b) en los cambios en la producción de proteína microbiana y en la degradación de proteína de la dieta, y en este sentido hay que tener en cuenta que los tiempos de retención pueden ser muy diferentes en el rumen y en los fermentadores.

Mansfield *et al.*, (1995) encontraron que el flujo de N microbiano como porcentaje de los flujos de N total y de N no amoniacal era menor en el rumen que en los fermentadores. Esto puede deberse a la contribución del N endógeno, inexistente en fermentadores. Cuando utilizaron un factor de corrección para el N endógeno, el N microbiano, expresado como porcentaje del flujo de N total, se hizo equivalente a la

proporción encontrada *in vitro*. La eficiencia de síntesis microbiana era mayor cuando las dietas se fermentaban en un cultivo continuo. La producción de bacterias y la eficiencia de su crecimiento dependen de la velocidad de crecimiento celular y de los requerimientos para el mantenimiento de esos microorganismos (Hespell y Bryant, 1979), por lo que los tiempos de retención más prolongados *in vivo* pueden dar lugar a menores eficiencias de síntesis comparadas con las que se obtienen en fermentadores (Mansfield *et al.*, 1995); además, la eficiencia es también mayor en CCF, porque se permite la homogeneización completa de la digesta, mientras que en el rumen la digesta se estratifica y pueden existir diferentes ambientes de fermentación, algunos de ellos con una tasa de renovación más lenta. Mansfield *et al.* (1995) observaron también que el flujo de glicina, arginina, histidina y lisina era menor en los fermentadores que *in vivo*. Estas diferencias pueden atribuirse a la contribución de las proteínas endógena y protozoaria, ya que la glicina es relativamente elevada en la fracción endógena y los protozoos contienen más lisina que la proteína bacteriana (Williams, 1986).

Las concentraciones de bacterias celulolíticas son parecidas *in vivo* e *in vitro* (Fuchigami *et al.*, 1989). El crecimiento lento de los microorganismos celulolíticos es un factor que puede afectar al desarrollo de estos microorganismos en fermentadores. Las bacterias aisladas en fermentadores se parecen más a las asociadas a la fase líquida del rumen, entre otras razones porque *in vitro* la agitación es constante y no permite una estratificación del contenido. También influye el menor tamaño de partícula de las dietas suministradas a los fermentadores, y la disminución o desaparición de protozoos. En el rumen, por existir más partículas sólidas y de mayor tamaño, las SAB son más abundantes.

Existen estudios en los que comparación de un Rusitec con un rumen natural no mostró diferencias en los parámetros fermentativos más importantes (Gizzi *et al.*, 1998). Muetzel *et al.* (2009) idearon un sistema en el cual se permite la formación de una masa en el interior de la vasija de fermentación en la que los protozoos pudieran sobrevivir, pero aunque obtuvieron una simulación bastante buena en lo referente a la composición de los productos finales y algunas actividades enzimáticas, observaron cambios importantes en las comunidades microbianas. Por otra parte, ha sido recientemente demostrado que tanto la diversidad estructural como la abundancia de bacterias y arqueas son comparables con las esperadas *in vivo* (Strobel *et al.*, 2008).

### **2.3.2. Técnicas moleculares como herramienta de estudio**

Hasta hace unos años, el ecosistema ruminal sólo había sido estudiado mediante técnicas basadas en cultivos microbianos, aislamiento, recuento y caracterización indirecta mediante productos de fermentación. Mediante estos métodos se ha llegado a conocer aproximadamente un 10-20% de los habitantes del rumen (unas 200 especies de bacterias y 100 de hongos y protozoos), subestimando ampliamente tanto la diversidad como el número de microorganismos. En las dos últimas décadas se han desarrollado técnicas no dependientes de los cultivos, basadas en los ácidos nucleicos, que permiten la identificación de un número mucho más amplio de microorganismos (Raskin *et al.*, 1997) y también ofrecen una idea de su función en el rumen o de las relaciones filogenéticas entre ellos (Woese, 1987).

La aplicación de estas técnicas requiere su previa adecuación al material ruminal; en este sentido, un aspecto clave es el relativo a la definición del marcador molecular a elegir, siendo los más utilizados los genes codificadores de las subunidades del RNA o del DNA ribosómico (16s en el caso de las bacterias y arqueas, y 18s en el caso de los protozoos; Whitford *et al.*, 1998; Tajima *et al.*, 2001; Kocherginskaya *et al.*, 2001).

El correcto estudio de la diversidad microbiana a partir de estas técnicas basadas en los ácidos nucleicos, así como el de la estructura de la comunidad, depende en gran medida del rendimiento del proceso de extracción de dichos ácidos, así como la pureza del mismo en la muestra extraída, puesto que los contaminantes pueden interferir en las pruebas posteriores. Limitándonos al DNA, los procedimientos de extracción dividen generalmente en tres pasos. El primero es la lisis de las células mediante diferentes métodos (ruptura mecánica de las células, congelación-descongelación, etc.). Posteriormente se precipitan los ácidos nucleicos y finalmente se libera el DNA de proteínas, RNA y se purifica.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) sirve de base para algunos métodos que se centran en caracterizar la huella (fingerprint) que dejan los fragmentos de DNA obtenidos mediante amplificación y separados electroforéticamente sobre un gel (de agarosa, de poliacrilamida, etc., dependiendo de las técnicas). Cada comunidad microbiana tiene su propia huella, lo cual permite diferenciarlas entre sí. La PCR está basada en la amplificación de un fragmento de DNA que es expuesto a la acción de una polimerasa termorresistente (*Taq* polimerasa, procedente del microorganismo termal abisal *Thermus aquaticus*) y a repetidos ciclos de desnaturalización, anillamiento y repolimerización. La clave está en el uso de oligonucleótidos complementarios con los extremos de la secuencia a

amplificar (cebadores o primers) que se unen a la cadena sencilla de DNA una vez que este se ha desnaturalizado, y a partir de la cual se crean dos nuevas cadenas de DNA gracias a la acción de la polimerasa. Estas nuevas cadenas serán posteriormente desnaturalizadas, y sufrirán un nuevo anillamiento por parte de los cebadores, seguido de otra polimerización, repitiéndose el ciclo numerosas veces.

La especificidad de los cebadores permite ampliar la secuencia de interés. La PCR tiene limitaciones: se pueden presentar problemas debidos a una incorrecta extracción o almacenamiento de las muestras (pueden existir compuestos potencialmente inhibidores de la *Taq* polimerasa). También es necesario elegir el cebador adecuado al tipo de muestra, y esto no siempre es sencillo.

Los genes utilizados normalmente para diferenciar taxonómicamente a las bacterias son los del fragmento 16S del RNA ribosómico. Esta fracción contiene algunas regiones altamente conservadas y otras que son muy variables, lo cual permite establecer relaciones filogenéticas. Los métodos basados en la PCR varían en función de los tratamientos a los que se somete posteriormente al DNA (digestiones enzimáticas, migración en distintos tipos de geles, etc).

Una forma de clasificar las técnicas moleculares empleadas en el estudio del ecosistema ruminal es dividir las en métodos cualitativos, cuando queremos estudiar el perfil de las comunidades existentes, y cuantitativos, que nos permiten conocer la cantidad de microorganismos de un determinado grupo o especie. Entre los primeros podemos citar la DGGE/ TGGE (electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización o de temperatura), los T-RFLP (polimorfismos de la longitud de los fragmentos terminales de restricción), los SSCP (polimorfismos conformacionales de cadena simple), el ARISA (análisis automatizado de los espacios intergénicos ribosomales), y la clonación y secuenciación. Entre los cuantitativos se incluyen la hibridación in situ o FISH, la hibridación slot-blot o la PCR a tiempo real.

Estos métodos han sido extensamente utilizados y revisados para el estudio de diversos ecosistemas microbianos (Raskin *et al.*, 1997; Mackie *et al.*, 1999), pero su aplicación a la microbiología digestiva y, en concreto, a la microbiología ruminal, se ha comenzado a desarrollar en los últimos años. Stahl *et al.* (1988) aplicaron por primera vez estos métodos en rumen de vacuno, concretamente utilizando sondas de hibridación marcadas para el rRNA 16S y trabajando con dos cepas de *Bacteroides succinogenes* y *Lachnospira multiparus* y analizando los efectos de la monensina en estas cepas. Posteriormente se han estudiado grupos específicos como las arqueas metanogénicas



(Whitford *et al.*, 2001), las bacterias fermentadoras de aminoácidos (Attwood *et al.*, 1998) o las celulolíticas (Reilly *et al.*, 2002). Koch *et al.* (2006) utilizaron los SSCP para estudiar perfiles y estructuras poblacionales en el rumen de ovino. Recientemente, Denman *et al.* (2008) utilizaron el ARISA para estudios en hongos ruminales.

Los estudios de biología molecular realizados a partir de material obtenido de pruebas *in vitro*, y en concreto de fermentadores, son escasos. Boguhn *et al.* (2008) describieron la diversidad estructural de las comunidades microbianas y cómo respondían a diferentes raciones en un sistema semicontinuo (Rusitec) mediante SSCP. Ranilla *et al.* (2008) compararon dos métodos, el SSCP y la DGGE para monitorizar las comunidades microbianas en fermentadores Rusitec y en CCF de flujo simple, concluyendo que las dos técnicas eran herramientas adecuadas en este tipo de estudio. Karnati *et al.* (2009) trabajaron en fermentadores continuos, analizando mediante DGGE los efectos producidos por diferentes inhibidores sobre los metanógenos en presencia/ausencia de protozoos. Otros ejemplos son los trabajos de Muetzel *et al.* (2009), quienes analizaron mediante slot-blot la evolución de las comunidades microbianas en un sistema de cultivo continuo estratificado, y Ranilla *et al.* (2009), que analizaron el efecto de la dieta en las comunidades microbianas en Rusitec y en CCF de flujo simple mediante SSCP.

Las dos técnicas utilizadas en los trabajos de esta Tesis Doctoral fueron los polimorfismos conformacionales de cadena simple (SCCP) y el análisis automatizado de los espacios intergénicos ribosomales (ARISA), que describimos brevemente a continuación.

#### 2.3.2.1. Polimorfismo conformacional de cadena simple

Esta técnica se basa en que, en condiciones no desnaturalizantes, una cadena simple de DNA adopta una conformación espacial que es específica de la composición de su secuencia nucleotídica. Estas cadenas simples de DNA se someten a electroforesis en gel en la que las secuencias avanzarán más o menos según su conformación y lo que ésta les permita migrar. La ventaja de esta técnica es poder diferenciar entre fragmentos del mismo tamaño pero diferente secuencia, detectando diferencias de tan solo un nucleótido y ofreciendo una alta resolución en el gel, con lo que se puede obtener una idea más clara de la diversidad microbiana. Comparada con la DGGE ofrece como ventajas una menor variabilidad entre geles (al no existir gradiente alguno en los mismos), y la presencia de una sola banda por cada especie bacteriana, en vez de dos como sucede en la DGGE (Hori *et al.*, 2005). Por estas razones, esta fue una de las

técnicas elegidas para la realización de análisis moleculares en uno de los trabajos de esta Tesis. Como desventajas podría apuntarse que es una técnica costosa en tiempo y dinero y que no permite analizar, y por tanto, comparar, más que un pequeño número de muestras simultáneamente.

#### 2.3.2.2. Análisis de los espacios intergénicos ribosomales

Este método es conocido por su acrónimo en inglés: RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis). La técnica crea un perfil basado en las diferencias interespecíficas de la longitud del fragmento entre las regiones que codifican para las subunidades 16S y 23S del ribosoma. Esta longitud varía de 50 a 1500 pares de bases y además, presenta una elevada variabilidad en la secuencia, lo que permite una identificación taxonómica con mayor detalle. Al igual que el resto de técnicas basadas en PCR convencional produce una huella o perfil de la estructura microbiana. Además, existe una variante automatizada (ARISA) que usa cebadores marcados fluorescentemente y un secuenciador automático de DNA, mejorando así la resolución y el análisis de la muestra, con lo que aumenta la eficiencia de la caracterización de la comunidad. El ARISA puede ser utilizado también para la caracterización de hongos, para lo cual se utiliza el RNAr que codifica para la subunidad 5,8 y dos fragmentos intergénicos que lo flanquean.

La principal ventaja del ARISA es su relativa sencillez, ya que para llevarla a cabo no son necesarias digestiones previas con enzimas de restricción como es el caso de los RFLP's o T-RFLP's ni elaborar un gel de electroforesis complejo con gradientes de temperatura o desnaturalizantes, obteniendo además, una alta sensibilidad para la diferenciación de comunidades, basado tanto en la longitud del fragmento como en su secuencia (Ranjard et al., 2001; Danovaro et al., 2006).

Tabla 2.1. Algunas aplicaciones de los sistemas de simulación de la fermentación *in vitro*.

<b>Tipo de estudio</b>	<b>Autor (es)</b>
Fermentación de carbohidratos	Czerkawski y Breckenridge, 1969; Bach <i>et al.</i> , 1999; Mansfield <i>et al.</i> , 1994
Producción de metano	Czerkawski y Breckenridge, 1969; García López <i>et al.</i> , 1999; Dong <i>et al.</i> , 1997
Tasa de renovación de los sólidos y los líquidos	Hoover <i>et al.</i> , 1976 a, b; Crawford <i>et al.</i> , 1980a, b; Fuchigami <i>et al.</i> , 1989; Schadt <i>et al.</i> , 1999
Defaunación	Fuchigami <i>et al.</i> , 1989
Suplementación nitrogenada	Hoover <i>et al.</i> , 1989; Mansfield <i>et al.</i> , 1994; Molina Alcaide <i>et al.</i> , 1996; Carro y Miller, 1999
Suplementación energética	Krishnamoorthy <i>et al.</i> , 1991
Suplementación probiótica	Windschitl, 1992
Sincronización de la liberación de nitrógeno y energía	Newbold y Rust, 1992; Bach <i>et al.</i> , 1999; Meng <i>et al.</i> , 1999
Tratamiento con álcalis	Stevani <i>et al.</i> , 1992; López <i>et al.</i> , 1999
Tratamiento con ácidos	Jalc <i>et al.</i> , 1989
Distribución espacial de los microorganismos ruminales	Czerkawski, 1986
Función ruminal en general y parámetros asociados	Hannah <i>et al.</i> , 1986; Calsamiglia <i>et al.</i> , 1999
Efecto de las deficiencias de fósforo sobre la actividad de los microorganismos ruminales	Komisarczuk <i>et al.</i> , 1987b

Efecto de la grasa y de la combinación de ácidos grasos sobre la fermentación ruminal	Jenkins, 1987
Digestión microbiana de subproductos	Durand <i>et al.</i> , 1988
Metabolismo de protozoos	Bonhomme, 1990
Uso de <sup>15</sup> N para la determinación de derivados púricos en el estudio del metabolismo nitrogenado	Aharoni y Tagari, 1991
Metabolismo de la tiamina microbiana en el rumen	Alves de Oliveira <i>et al.</i> , 1997
Cambios en las comunidades microbianas al cambiar las condiciones e interacciones entre especies	Russell <i>et al.</i> , 1981 ; Shi y Weimer, 1992 ; Newbold <i>et al.</i> , 1995
Efectos de compuestos naturales, aditivos y probióticos	Komisarkzuk <i>et al.</i> , 1987; Newbold <i>et al.</i> , 1995 ; Cardozo <i>et al.</i> , 2004 ; Castillejos <i>et al.</i> , 2005, 2006
Sinergia y asociaciones entre alimentos	Russell y Dombrowski, 1980
Efecto de micotoxinas y antibióticos	Masoero <i>et al.</i> , 1999; Russell y Strobel, 1989
Digestibilidad de los nutrientes	Karunanandaa y Varga, 1996
Evaluación de forrajes de baja calidad	Morrison y brice, 1984; Jayasuriya <i>et al.</i> , 1987
Fuentes de N y su metabolismo	Cotta y Russell, 1982 ; Calsamiglia <i>et al.</i> , 1995 ; Bach <i>et al.</i> , 1999; Griswold <i>et al.</i> , 2003
Efecto del tipo de carbohidratos y las interacciones carbohidratos-proteína	Chester-Jones <i>et al.</i> , 1991; Bach <i>et al.</i> , 1999; Rodríguez-Prado <i>et al.</i> , 2004; Hoover <i>et al.</i> , 2006

Metabolismo de los ácidos grasos y biohidrogenación	Fellner <i>et al</i> , 1995 ; Qiu <i>et al</i> , 2004 ; AbuGhazaleh <i>et al</i> , 2005 ; Lourenço <i>et al</i> , 2008
Efecto del pH	Erfle <i>et al</i> , 1982 ; de Veth y Kolver, 2001 ; Calsamiglia <i>et al</i> , 2003; Yang <i>et al</i> , 2002 ; Calsamiglia <i>et al</i> , 2008
Efectos de las tasas de dilución de líquidos y sólidos sobre los protozoos	Hoover <i>et al</i> 1976; Crawford <i>et al</i> 1980a; Hoover <i>et al</i> 1984
Efecto adición de enzimas a la dieta	Yang <i>et al</i> , 2002; Colombatto <i>et al</i> , 2007
Evaluación de subproductos en la alimentación	Durand <i>et al</i> 1988; Mansfield <i>et al</i> , 1994; Martín-García <i>et al</i> , 2006



*Capítulo 3*  
*Material y métodos*





En cada uno de los trabajos que componen esta Tesis Doctoral se describen con detalle los materiales y métodos empleados. A continuación se describen únicamente los animales experimentales, los dos sistemas *in vitro* usados en las pruebas experimentales y aquellos procedimientos analíticos que han sido utilizados en la mayoría de los trabajos.

### **3.1. Animales experimentales**

A lo largo de todos los experimentos se dispuso de ocho ovejas adultas de raza Merina ( $55,20 \pm 2,12$  kg de peso vivo), todas ellas provistas de una cánula ruminal permanente. Cuatro de las ovejas estaban provistas adicionalmente de una cánula en "T" colocada en el duodeno proximal. Los animales se operaron dos meses antes del inicio de las pruebas experimentales. La colocación de la cánula de plástico rígido (40 mm de diámetro interno) en el saco dorsal del rumen se llevó a cabo mediante la técnica de la doble incisión descrita por Komarek (1981). La cánula duodenal era de plástico flexible, medía 20 mm de diámetro interno y se implantó a 5 cm del píloro. Las intervenciones quirúrgicas fueron realizadas en los quirófanos de cirugía de la Facultad de Veterinaria de León. Previamente a la intervención quirúrgica, los animales fueron mantenidos en ayuno de comida y de agua durante 24 y 12 horas, respectivamente. Tras la operación se les administró un antibiótico de amplio espectro durante siete días, limpiando diariamente la zona afectada con agua templada y yodo diluido. Una vez transcurrido el periodo postoperatorio, el mantenimiento y limpieza de las cánulas consistió en un lavado con una solución de yodo y aclarado con agua tibia dos veces a la semana.

Durante todo el periodo experimental las ovejas estuvieron alojadas en jaulas individuales, donde recibieron diariamente una dieta experimental que varió en función del experimento realizado. 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. 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: fermentadores de flujo semicontinuo (Rusitec) y cultivos discontinuos de microorganismos ruminales (BCRM).

### **3.2.1. Sistema de fermentadores de flujo semicontinuo (Rusitec)**

#### 3.2.1.1. Descripción del sistema

El sistema de fermentadores de flujo semicontinuo utilizado en los experimentos fue el Rusitec (Rumen Simulation Technique), que fue construido siguiendo el modelo descrito por Czerkawski y Breckenridge (1977), con algunas modificaciones realizadas por nuestro grupo de trabajo. El sistema instalado en nuestro laboratorio consta de 16 fermentadores sumergidos en un baño de agua a 39°C (ver Figura 3. 1). Cada fermentador está formado por un cilindro de plástico rígido de 600 mL de volumen efectivo, cerrado con una tapa provista de tres orificios. A través de uno de los orificios se infunde continuamente una solución tampón (saliva artificial) impulsada mediante una bomba peristáltica. Otro de los orificios está conectado, a través de un tubo impermeable a los gases, a un matraz donde se recoge el efluente que rebosa del fermentador. A su vez, este matraz está conectado en su parte superior a una bolsa hermética (Tecobag, Tesseraux Container GMBH, Alemania) 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.

Dentro de cada fermentador hay una base plástica perforada donde se fijan las bolsas de nailon con el alimento. Dicha base está unida mediante un eje rígido, que atraviesa la tapa del fermentador por el centro, a un motor que hace que mantenga un movimiento cíclico ascendente-descendente en el interior del mismo (cinco ciclos completos por minuto). De esta manera, se produce una agitación continua del medio de fermentación y se fuerza al contenido líquido del fermentador a pasar a través del material sólido en cada movimiento, simulando así los movimientos peristálticos del rumen.

#### 3.2.1.2. Manejo del sistema

El manejo básico del Rusitec a lo largo de un experimento se puede dividir en dos fases: una fase inicial, de inoculación del sistema y adaptación de los microorganismos ruminales a las condiciones experimentales, y una segunda fase, de muestreo, en la que se determinan los principales parámetros de fermentación y el crecimiento microbiano. En las pruebas experimentales, se utilizó como inóculo el contenido ruminal mezclado de las ovejas donantes, el cual se extrajo inmediatamente antes de la alimentación de los

animales, se filtró a través de dos capas de gasa, y se recogieron ambas fracciones (sólida y líquida) en termos aislantes con el fin de mantener su temperatura y evitar el contacto con el aire durante su traslado al laboratorio. El primer día de la prueba experimental, cada fermentador se llenó con 250 mL de líquido ruminal y 200 mL de saliva artificial (McDougall, 1948).



**Figura 3.1.** Sistema de fermentadores de flujo semicontinuo (Rusitec; Rumen Simulation Technique; Czerkawski and Breckenridge, 1977)

Dentro del contenedor perforado se introdujo una bolsa de nailon (100  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro) con 80 g de contenido sólido ruminal y dos bolsas con el alimento correspondiente en cada experimento, una de ellas con forraje y otra con concentrado. Antes de ser introducidas en la vasija, las bolsas se impregnaron con el medio líquido (mezcla de fluido ruminal y saliva artificial), con el fin de eliminar el aire en su interior

y facilitar la colonización del alimento por los microorganismos ruminales. Una vez introducidas y fijadas las bolsas a la base plástica, 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 cada matraz destinado a la recogida del efluente se añadieron 20 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) al 20% (vol:vol) con el fin de detener el proceso fermentativo. A continuación, cada fermentador se gaseó con 2 L de  $CO_2$  para establecer condiciones de anaerobiosis dentro del mismo, y se conectaron los tubos para la recogida de gas a las bolsas correspondientes. Finalmente, una vez que todas las conexiones fueron aseguradas, se puso en marcha el motor del sistema. La duración del proceso de manipulación de los fermentadores fue, en todos los casos, inferior a 30 minutos.

En cada prueba experimental, se llevó a cabo una fase de adaptación con la finalidad de conseguir unas condiciones de fermentación estables dentro de los fermentadores. El manejo del sistema durante cada uno de estos días se describe a continuación. Una vez transcurridas 24 horas tras la inoculación del sistema, se apagó el motor de agitación y cada fermentador se gaseó con 2 L de  $CO_2$ , con el fin de desplazar los gases producidos durante la fermentación hasta la bolsa destinada a su recogida, la cual se cerró y se retiró del sistema. A continuación, se desconectaron los tubos de la saliva y del efluente, se extrajo el fermentador y se introdujo en otro baño de agua ( $39^\circ C$ ) de menor tamaño, donde se pudo manejar cómodamente evitando que descendiera la temperatura en su interior. Antes de abrir el fermentador, se agitó varias veces el eje unido a la base plástica con las bolsas de alimento para homogeneizar el contenido. Una vez abierto se midió el pH (pH-metro Basic 20, Crison) del medio y se extrajo la bolsa de alimento que llevaba 48 horas dentro de la vasija (el segundo día de incubación se extrajo la bolsa portadora de contenido ruminal sólido). La bolsa de alimento extraída se sometió a dos lavados sucesivos, cada uno con 40 mL de contenido líquido del fermentador. Los 80 mL del líquido procedente de estos dos lavados se emplearon para impregnar la bolsa de alimento que iba a ser introducida a continuación en el fermentador. La bolsa de alimento se fijó a la base plástica y el resto del líquido de lavado se vertió en el fermentador. Finalmente, se cerró el fermentador y se colocó dentro del baño de agua.

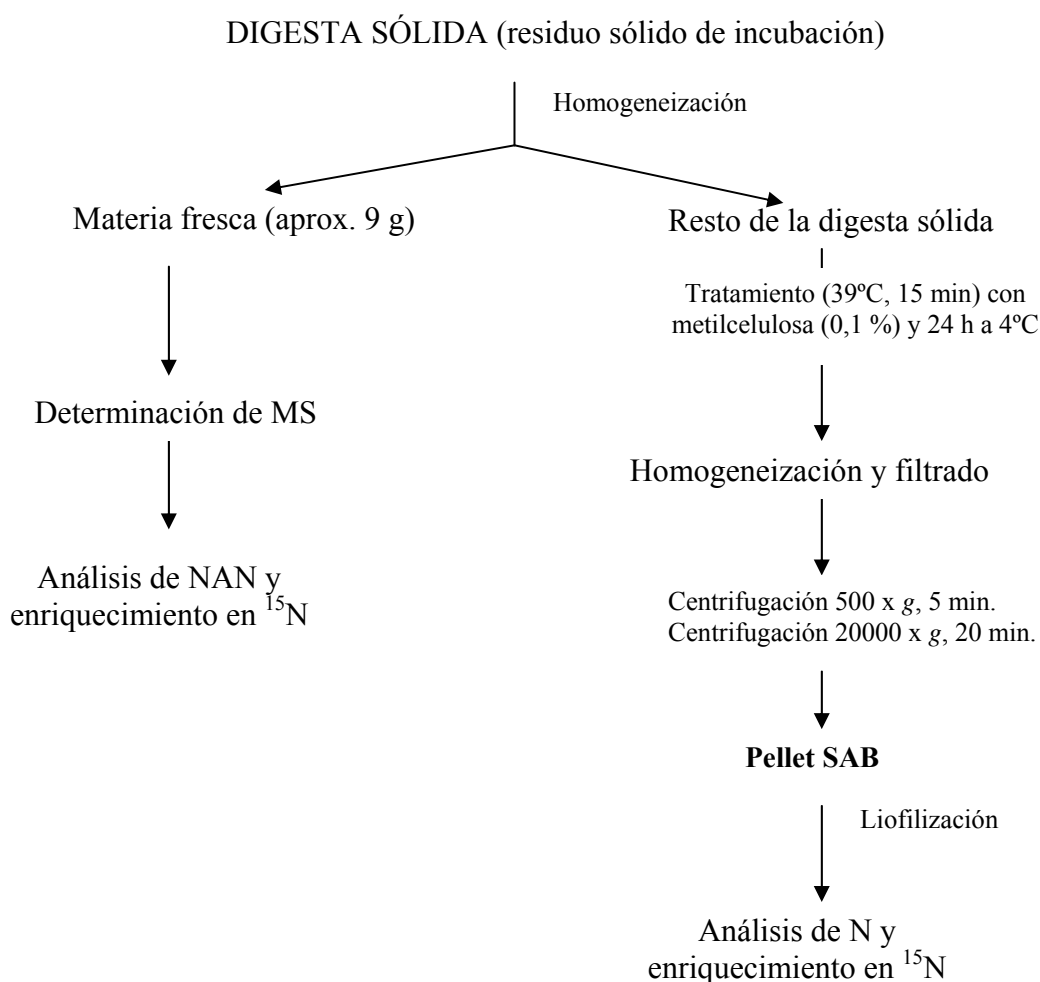
Diariamente, el efluente recogido en cada matraz se pesó y se descartó. Antes de colocar de nuevo el matraz en su lugar, se añadieron 20 mL de  $H_2SO_4$  al 20 %. Una vez que todos los fermentadores fueron colocados en el sistema, se conectaron los tubos de

la saliva y del efluente, se gaseó cada fermentador con 2 L de CO<sub>2</sub>, se conectaron las bolsas de recogida de gases y se puso en marcha el motor. Este manejo se repitió cada día del periodo de adaptación.

Una vez transcurrido este periodo, comenzó la fase de muestreo. En esta fase el manejo básico del Rusitec se realizó igual que en la fase anterior y, adicionalmente, se tomaron diferentes muestras. Durante dos días de cada periodo experimental se determinó la síntesis de proteína microbiana en las fases sólida y líquida del sistema. Para ello, cinco días antes de la recogida de muestras se añadió a cada fermentador una dosis de una solución de cloruro amónico (<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl) (98 % de enriquecimiento; Sigma Chemical Co., Madrid, España) como marcador microbiano. A partir de este momento se añadió <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl a la saliva artificial, de tal forma que cada fermentador recibió diariamente la dosis prefijada. Asimismo, durante estos días, en los matraces de recogida del efluente se sustituyeron los 20 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 20 % por 5 mL de una solución saturada de cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>), con el fin de detener el crecimiento microbiano sin producir la lisis de los microorganismos. La recogida de muestras para la determinación de la síntesis de proteína microbiana se describe a continuación.

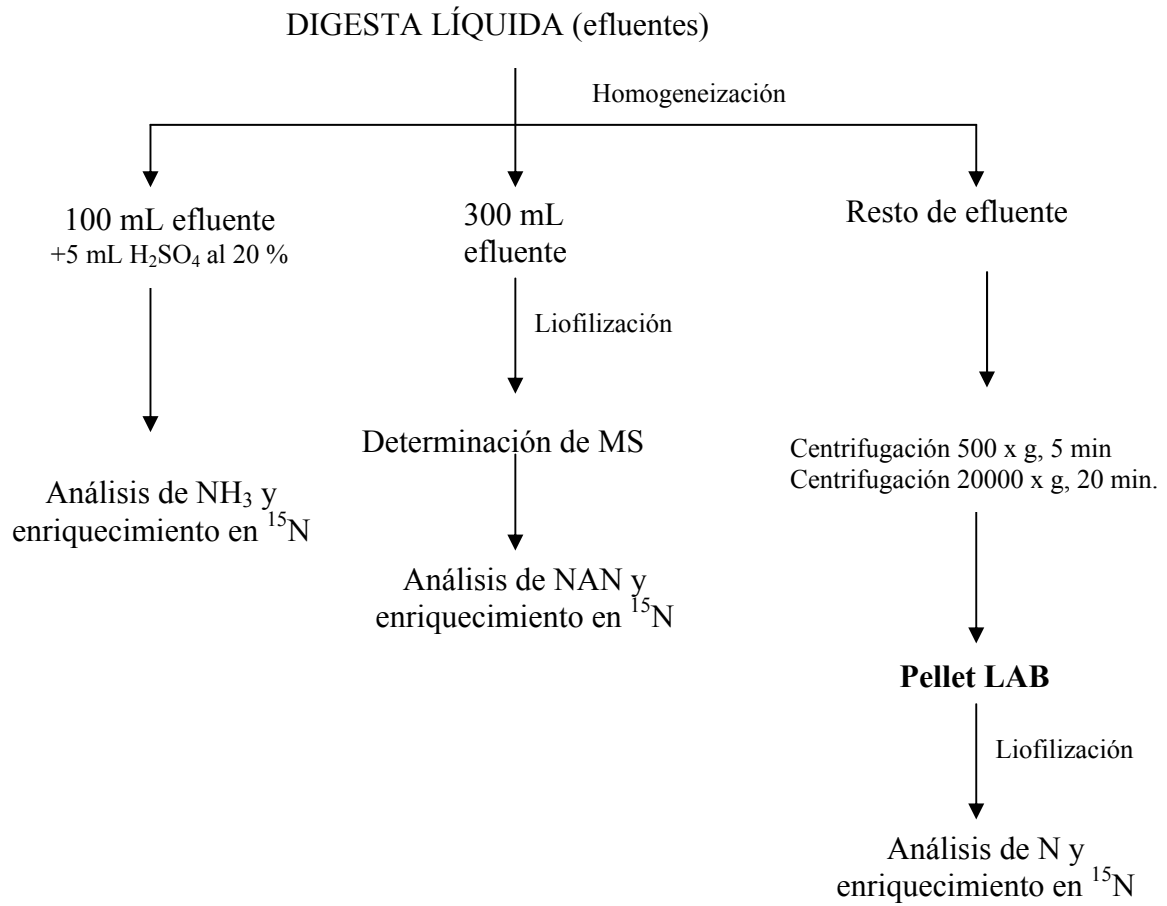
El contenido de la bolsa de nailon (digesta sólida) que se extrajo cada día se pesó, se homogeneizó y se tomó una muestra (aproximadamente 9 g) que fue liofilizada para determinar su contenido en MS (ver Figura 3. 2). Las muestras de los dos días se mezclaron, se molieron (1 mm) y se analizó su contenido en nitrógeno no amoniacal (NAN) y su enriquecimiento en <sup>15</sup>N. El resto del contenido sólido de la bolsa se sometió (inmediatamente tras su recogida) a un tratamiento con una solución salina (0,85% NaCl) de metilcelulosa al 0,1% para desligar las bacterias asociadas a la fase sólida (SAB). Para ello, el residuo sólido se mezcló con dicha solución (3 mL de solución por cada g de residuo) y se mantuvo en un baño de agua a 39°C durante 15 minutos bajo agitación continua. Pasado ese tiempo, se añadieron 25 mL de solución de metilcelulosa fría (4°C) y la mezcla se mantuvo a 4°C durante 24 horas. Posteriormente, la suspensión se homogeneizó durante 1 minuto con una batidora de varillas y se filtró a través de una tela de nailon de 100 µm de diámetro de poro. El residuo de la filtración se suspendió nuevamente en la solución de metilcelulosa, se homogeneizó de nuevo y se filtró. Esta última operación se repitió y el filtrado total obtenido se utilizó para aislar las SAB mediante centrifugación diferencial. Antes de proceder al aislamiento de las SAB se mezclaron los filtrados obtenidos los dos días de muestreo.

La centrifugación diferencial consistió en someter al filtrado a una primera centrifugación (500 x g, 5 minutos, 4°C) para eliminar las partículas de alimento, descartando el pellet. El sobrenadante se centrifugó de nuevo (20000 x g, 20 minutos, 4°C). En esta ocasión se descartó el sobrenadante, y el pellet obtenido se resuspendió en solución salina (0,85 % NaCl) antes de ser centrifugado nuevamente (20000 x g, 20 minutos, 4°C), siendo el pellet obtenido en esta última centrifugación el pellet de SAB, que fue liofilizado para posteriormente analizar en él su contenido en N y su



enriquecimiento en  $^{15}\text{N}$ . El efluente obtenido de cada vasija durante los dos días de determinación de la síntesis microbiana se pesó y se mezcló. De esta mezcla se tomó una muestra (100 mL) que se acidificó con 5 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 20 % y se congeló a  $-20^\circ\text{C}$  para analizar su contenido en  $\text{NH}_3$  y el enriquecimiento del mismo en  $^{15}\text{N}$ .

**Figura 3.2.** Proceso al que se sometió la digesta líquida de los fermentadores y aislamiento de las bacterias asociadas a la fase sólida (SAB)



**Figura 3.3.** Proceso al que se sometió la digesta líquida de los fermentadores y aislamiento de las bacterias asociadas a la fase líquida (LAB)

En torno a 300 mL de efluente se recogieron y se dividieron en dos alícuotas de 150 mL, que fueron liofilizadas para determinar su contenido en MS. Posteriormente, estas dos muestras se mezclaron y se analizó su contenido en NAN y su enriquecimiento en  $^{15}\text{N}$ . El resto de efluente se utilizó para aislar las bacterias asociadas a la fase líquida (LAB) mediante centrifugación diferencial, tal y como se ha descrito anteriormente para las SAB. Una vez obtenido el pellet de LAB se analizó su contenido en N y enriquecimiento en  $^{15}\text{N}$ .

Durante los cuatro días siguientes se recogieron las muestras que se describen a continuación:

- Las bolsas de recogida del gas se almacenaron para medir posteriormente el volumen de gas producido y su concentración en metano.

- El efluente acumulado diariamente en los matraces se pesó y se recogieron muestras para analizar su concentración en NH<sub>3</sub> (2 mL), ácidos grasos volátiles (VFA; 1 mL) y láctico (1 mL). Dichas muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.
- Las bolsas de nailon con el residuo sólido de alimento no degradado que se extrajeron de los fermentadores se lavaron con 80 mL de contenido líquido del fermentador como se ha descrito anteriormente. Posteriormente, se lavaron durante 20 minutos en una lavadora automática en un programa de agua fría, y se secaron en estufa a 60°C durante 48 horas. Finalmente, las bolsas se pesaron y se calculó la desaparición de MS. El residuo de alimento no degradado se molió a 1 mm y se analizó su contenido en fibra neutro detergente (NDF) y fibra ácido detergente (ADF).
- Adicionalmente, alguno de los días de muestreo se tomaron muestras para recuento de protozoos y para determinar la actividad enzimática. Cinco mL del contenido de los fermentadores se mezclaron con 5 mL de una solución fijadora (Ogimoto e Imai, 1981), y las muestras se conservaron a temperatura ambiente y en oscuridad hasta el recuento de protozoos. Para determinar la actividad enzimática se tomaron 3 mL del contenido líquido de los fermentadores y se congelaron inmediatamente a -80°C hasta el momento de realizar los análisis.

### **3.2.2. Sistema de cultivos discontinuos de microorganismos ruminales (BCRM)**

Las incubaciones *in vitro* en BCRM se llevaron a cabo en viales de vidrio de 120 mL de capacidad, en cada uno de los cuales se pesaron 500 mg de MS del sustrato correspondiente. Todos los sustratos utilizados en este tipo de pruebas se molieron previamente a un tamaño máximo 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 microbiano. El contenido ruminal se extrajo de cada oveja inmediatamente antes de la administración del alimento, se introdujo en termos aislantes e inmediatamente se trasladó al laboratorio, con el fin de mantener la temperatura y evitar el contacto con el aire. 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). Como medio de cultivo se empleó el descrito por Goering y Van Soest (1970) sin tripticasa.



Para la preparación del medio de cultivo se añadieron sucesivamente (por litro de medio): 475,0 mL de agua destilada, 237,5 mL de una disolución mineral, 1,25 mL de una disolución de oligoelementos, 237,5 mL de una disolución tampón, 1,25 mL de una disolución de resazurina y 47,5 mL de una disolución reductora. La composición de cada una de las disoluciones utilizadas fue:

- Disolución mineral (por litro de disolución)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,6 g

- Disolución de oligoelementos (por litro de disolución)

CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	13,2 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	10,0 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,0 g
FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	8,0 g

- Disolución tampón (por litro de disolución)

NaHCO <sub>3</sub>	37,0 g
(NH <sub>4</sub> )HCO <sub>3</sub>	2,0 g

- Disolución de resazurina (por litro de disolución)

Resazurina	1,0 g
------------	-------

- Disolución reductora (por litro de disolución)

Cisteína-HCl	6,25 g
NaOH (1N)	40,0 mL
Na <sub>2</sub> S	6,25 g

La mezcla de todos los componentes del medio de cultivo, la del medio de cultivo con el fluido ruminal y su dosificación (50 mL) dentro de los viales se realizó en condiciones de anaerobiosis (gaseado continuo con CO<sub>2</sub>) y a una temperatura a 39°C. Tras la dosificación, los viales se cerraron herméticamente con un tapón de caucho, se precintaron con cápsulas de aluminio (ver Figura 3. 4) y se colocaron en un incubador a 39°C.



**Figura 3.4.** Cultivos discontinuos de microorganismos ruminales

Los viales permanecieron dentro del incubador durante 24 h y posteriormente se abrieron y se determinaron los siguientes parámetros:

- pH
- Producción de gas y de metano ( $\text{CH}_4$ )
- Producción de VFA
- Concentración en  $\text{NH}_3$  y láctico del medio
- Desaparición del sustrato (MS y NDF)

El proceso de toma de muestras para la determinación de estos parámetros se describe detalladamente en cada una de las pruebas experimentales.

### **3.3. Procesado de las muestras y análisis químicos**

#### **3.3.1. Producción de gas y su composición**

La producción diaria de gas (L/d) se midió conectando la bolsa de recogida del gas a una bomba de vacío, la cual, a su vez, se conectó con un medidor de volumen de gas (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 en  $\text{CH}_4$  del gas 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). Para ello, se tomaron dos muestras de gas (0,6 mL) que se inyectaron en el cromatógrafo. El cálculo de la concentración en CH<sub>4</sub> se realizó mediante la comparación con un estándar de concentración de CH<sub>4</sub> conocida (10%).

### **3.3.2. Análisis de la composición química**

El contenido en MS de las muestras se determinó mediante desecación a 100°C en una estufa de ventilación forzada hasta alcanzar un peso constante (AOAC, 1999). Las muestras que presentaban un alto porcentaje de humedad (digestas sólida y líquida y pellet microbianos) se liofilizaron antes de su secado final en la estufa. El contenido en 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 en FND se analizó siguiendo la técnica secuencial descrita por Van Soest *et al.* (1991), adoptando las modificaciones propuestas por ANKOM Technology Corporation (1998). El contenido en FAD se analizó siguiendo la técnica secuencial descrita por Goering y Van Soest (1970), adoptando las modificaciones propuestas por ANKOM Technology Corporation (1998). Para el análisis se utilizaron bolsas de poliéster (Ankom Corp #57) con un tamaño de poro de 30 µm y unas dimensiones de 5,5 x 5,5 cm.

El contenido en N se determinó mediante el método Kjeldahl (AOAC, 1999), utilizando un equipo de destilación Kjeltex System 1002 (Tecator). En aquellas muestras en las que posteriormente se determinó su enriquecimiento en <sup>15</sup>N, el proceso de destilación se realizó tal y como se describe en el apartado de análisis de N amoniacal por destilación. El contenido en proteína bruta se obtuvo multiplicando el contenido en N de la muestra por el factor de conversión 6,25.

La determinación del nitrógeno no amoniacal (NAN) se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Firkins *et al.* (1992), mediante la cual el NH<sub>3</sub> es eliminado de las muestras antes de analizar su contenido en N. Para ello, las muestras (1 g) se humedecieron con 9 mL de hidróxido sódico (NaOH) 1M, y tras comprobar que se alcanzó un pH superior a 10, se mantuvieron en una estufa a 90°C durante 16 horas. Una vez que el NH<sub>3</sub> se eliminó por evaporación, se determinó el contenido en nitrógeno no amoniacal (NAN) de las muestras, tal y como se ha descrito anteriormente.

### 3.3.3. Amoniaco

En función de las muestras obtenidas, se realizaron dos tipos de análisis de  $\text{NH}_3$ , uno por un método colorimétrico y otro por destilación. El análisis de  $\text{NH}_3$  por colorimetría se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Weatherburn (1967). Este método está basado en la reacción del  $\text{NH}_3$  presente en la muestra con fenol e hipoclorito sódico ( $\text{NaClO}$ ), de tal forma que se produce indofenol. El indofenol es un compuesto de color azul cuya lectura espectrofotométrica se realiza a una longitud de onda de 625 nm. Para este análisis, las muestras se descongelaron y se centrifugaron a  $10000 \times g$  durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante obtenido se diluyó 50 veces con agua destilada. De esta dilución se tomó 1 mL y se mezcló con 5 mL de una solución formada por fenol (10 g/L) y nitroprusiato sódico (50 mg/L). Tras mezclar en un agitador durante 20 segundos se añadieron 4 mL de una solución compuesta por  $\text{NaOH}$  (5 g/L) y  $\text{NaClO}$  (8,4 mL/L), se agitó de nuevo y se introdujo en un baño con agua a  $39^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se leyó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (Ultrospec 500 pro, Amersham-Biosciences<sup>®</sup>, Barcelona, España) a una longitud de onda de 625 nm. Para la realización de la curva patrón se utilizó una solución de sulfato amónico ( $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ) 50 mM (0,6607 g/100mL de agua destilada).

La determinación de  $\text{NH}_3$  por destilación se realizó únicamente en aquellas muestras en las que posteriormente se determinó su enriquecimiento en  $^{15}\text{N}$ . Estas muestras se descongelaron a  $4^\circ\text{C}$  y se centrifugaron a  $20000 \times g$  durante 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . A continuación, se tomaron 80 mL del sobrenadante y se sometieron a una destilación directa con  $\text{NaOH}$  (Kjeltec System 1002, Tecator). El destilado se recogió sobre 25 mL de una solución de ácido bórico ( $\text{B}(\text{OH})_3$ ) al 0,5 % y se valoró con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2N. Una vez valoradas las muestras, el destilado se acidificó en exceso con 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N, para prevenir pérdidas de N en forma de  $\text{NH}_3$  y una posible contaminación microbiana. A continuación las muestras se evaporaron a  $55^\circ\text{C}$  y se resuspendieron en agua destilada hasta alcanzar una concentración en N de como mínimo 3 mg/mL (concentración necesaria para un adecuado análisis de su enriquecimiento en  $^{15}\text{N}$ ).

### 3.3.4. Láctico

La determinación de la concentración en ácido láctico de las muestras se realizó siguiendo la técnica descrita por Taylor (1995), que se basa en la reacción del ácido láctico presente en la muestra con parafenilfenol y sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) en

presencia de ácido sulfúrico y calor, produciéndose un compuesto que absorbe la luz a 570 nm. Para este análisis, las muestras se descongelaron y se centrifugaron a 10000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se diluyó 50 veces con agua destilada. De esta dilución se tomaron 500 µl y se mezclaron con 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tras mezclar en un agitador durante 20 segundos se incubó en un baño a 100°C durante 10 minutos. Posteriormente se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente (25°C) y se añadieron 50 µl de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) al 4%. Se agitó durante 20 segundos y se añadieron 100 µl de parafenilfenol al 1,5 % en etanol al 95%. Tras agitar durante otros 20 segundos, se introdujo en un baño a 30° durante 60 minutos. Transcurrido ese tiempo, se leyó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (Ultrospec 500 pro, Amersham-Biosciences<sup>®</sup>, Barcelona, España) a una longitud de onda de 570 nm. Para la realización de la curva patrón se utilizaron soluciones de ácido láctico de concentración conocida.

### **3.3.5. Recuentos de bacterias totales y celulolíticas**

El recuento de bacterias totales se realizó según el método del número más probable (MPN) descrito por Dehority *et al.* (1989). Para ello se realizó una mezcla (3:1) de medio de cultivo con una suspensión de celulosa (30 g/L). Siete mL de esa mezcla fueron introducidos en tubos de 15 mL de capacidad. Posteriormente, esos tubos fueron inoculados con líquido procedente de los fermentadores bajo condiciones anaerobias, previamente diluido (diluciones desde 10<sup>-5</sup> hasta 10<sup>-11</sup>) y se incubaron durante 15 días a 39°. La celulosa al precipitarse en el fondo del tubo forma una capa diferenciada del medio, en la cual eventualmente se puede observar su degradación. La presencia de bacterias celulolíticas se estimó de forma visual directa, identificando la degradación de la celulosa. El número de bacterias totales se estimó en base al método del número más probable, midiendo el pH en cada uno de los tubos de cultivo. En el caso de que el pH en un tubo fuera menor o igual que el valor obtenido al restar 0,20 al pH medio de los tubos control, se consideró el tubo positivo para bacterias totales.

### **3.3.6. Ácidos grasos volátiles**

Las muestras que se recogieron para analizar su concentración en VFA se descongelaron a 4°C y se centrifugaron a 15500 x g durante 10 minutos a 4°C. A continuación, se mezclaron 0,8 mL del sobrenadante con 0,5 mL de una solución acidificante y desproteinizante (ácido metafosfórico (10 %) y ácido crotónico (0,06 %) en ácido clorhídrico (HCl) 0,5 N). La mezcla obtenida se dejó reposar durante 12 horas

en frío (4°C) y se centrifugó en las condiciones anteriormente mencionadas antes de proceder a su trasvase a viales de cromatografía. Las muestras procedentes de los efluentes de los fermentadores no fueron acidificadas, ya que se habían recogido sobre H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La concentración en VFA (acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico y caproico) se determinó mediante cromatografía de gases, en un cromatógrafo Pelkin Elmer Autosystem XL equipado con un inyector automático, un detector de ionización de llama y una columna semicapilar TR-FFAP de 30 m x 0.53 mm x 1 µm (Supelco, Barcelona, España).

### **3.3.7. Análisis del enriquecimiento en <sup>15</sup>N**

El enriquecimiento en <sup>15</sup>N de los pellets microbianos (SAB y LAB), de las digestas (sólida y líquida) y del NH<sub>3</sub> se determinó mediante un espectrofotómetro de masas (VG PRISM II; IRSM) conectado a un analizador elemental (DUMAS-style N analyser ES 1108, Carlo Erba, Milán Italia). Las muestras sólidas fueron sometidas al proceso descrito para el análisis de N; a continuación, todas ellas se destilaron con NaOH (Kjeltec System 1002, Tecator), el destilado se recogió sobre 25 mL de una solución de ácido bórico (0,5 %) y se valoró con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2N. Una vez valoradas las muestras, el destilado se acidificó en exceso con 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, para prevenir pérdidas de N en forma de NH<sub>3</sub> y una posible contaminación microbiana. A continuación las muestras se evaporaron a 55°C en una campana de flujo laminar hasta que su concentración en N fue de al menos 3 mg/mL.

### **3.3.8. Análisis de la actividad enzimática**

Para la determinación de la actividad enzimática en las muestras, estas fueron descongeladas, y se procedió a la lisis de las células utilizando un Mini-Beadbeater (BioSpec Products Inc., Bartlesville, OK, EEUU) para liberar las enzimas intracelulares. El tratamiento consistió en tres pulsos de sesenta segundos a 4°C utilizando bolas de sílice de 0,1mm. El material celular no lisado se eliminó por centrifugación (10000 x g, 10 min, 4°C) y el sobrenadante (200 µL) se utilizó para los análisis. Se determinaron las actividades carboximetilcelulasa, xilanasas y amilasa siguiendo el procedimiento descrito por Colombatto y Beauchemin (2003) con las modificaciones descritas por Giraldo *et al.* (2008), utilizando como sustratos carboximetilcelulosa, xilano de avena y almidón soluble, respectivamente (Sigma-Aldrich Química S. A., Madrid, España). Las actividades enzimáticas se expresaron como nanomoles de glucosa o xilosa liberados de

los correspondientes sustratos por 1 mL de fluido ruminal en 1 minuto a 39°C y a pH 6.5.

### **3.3.9. Recuento de protozoos**

Con el fin de realizar el recuento de los protozoos, 2 mL del contenido líquido de los fermentadores se mezclaron con 2 mL de solución fijadora (formalina al 50% con 18,5% de formaldehído). La mezcla se agitó suavemente y los tubos con las muestras se almacenaron a temperatura ambiente en oscuridad para su posterior recuento. Las alícuotas se contaron por duplicado utilizando una cámara de recuento Hauser-Nageotte Bright Line (0,5 mm de profundidad; Hauser Scientific, Horsham, PA, EEUU) a un aumento que varió entre 20x y 100x. Se identificaron las familias Isotrichidae y Ophryoscolecidae, y dentro de esta las subfamilias Entodiniinae, Diplodiniinae y Ophryoscolecinae, siguiendo las descripciones de Dehority (1993). Cuando el coeficiente de variación entre réplicas fue mayor del 10% se repitió el recuento.

## **3.4. Técnicas moleculares**

### **3.4.1. Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (Single Strand Conformation Polimorphysm, SSCP)**

Con el fin de analizar la similitud relativa entre las comunidades microbianas ligadas al sustrato y las obtenidas en los pellets bacterianos tras los procedimientos de desligamiento utilizados en una de las pruebas experimentales, se aisló el DNA de los residuos de forraje y concentrado (120 mg MS) y de los pellets bacterianos (30 mg de MS), siguiendo la técnica descrita por Yu y Morrison (2004). Se amplificó un fragmento del gen 16S del RNA ribosómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos de la región V3-4, el B342If y el U806Ir (Hori *et al.*, 2006), de los cuales, el cebador reverso estaba fosforilado en el extremo 5'. Cada mezcla de PCR (100 µL de volumen final) contenía tampón de reacción PCR 1X, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 µM de cada cebador (Sigma; Madrid, España), cada desoxinucleósido trifosfato en una concentración de 0,2mM y 5 U de Taq polimerasa (Biotools, Madrid, España). La PCR se realizó en un termociclador 2720 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EEUU). Se inició con un ciclo de desnaturalización inicial (94°C, 300 s) seguido de 35 ciclos de desnaturalización (94°C, 60 s), anillamiento (50°C, 60 s) y elongación (72°C, 90 s), con un paso final de

extensión a 72°C durante 240 s. El tamaño y calidad de los productos de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y fueron posteriormente purificados usando un kit Qiaquick PCR Purification (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El DNA eluido se cuantificó fluorométricamente usando un Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, DE, EEUU). Los fragmentos de cadena simple se obtuvieron a partir de los productos de la PCR eliminando la hebra fosforilada en el extremo 5' mediante una digestión con  $\lambda$ - exonucleasa. Un  $\mu$ g de DNA se digirió durante 90 min a 37°C en un volumen total de 40  $\mu$ l con 2,5 U de  $\lambda$ -exonucleasa en tampón exonucleasa 1X (New England Biolabs, MA, EEUU). El producto de la PCR se purificó con columnas del MiniElute DNA cleanup system (Qiagen, Hilden, Alemania).

La SSCP se llevó a cabo en un gel de MDE al 0,625% (BioScience Rockland, Inc., Rockland, ME, EEUU) en un tampón TBE 1X (tris-borato-EDTA) utilizando un sistema DCode (Biorad, El Prat de Llobregat, España). Antes de ser cargadas en el gel, las muestras fueron desnaturalizadas en un tampón (10 mN NaOH, 0,25% xilenocianol, 0,25% bromofenol azul y 95% formamida) a 95°C durante 3 min y posteriormente enfriadas en hielo durante 3 min. La electroforesis se llevó a cabo a 20°C y 15 mA durante 20 h. Los perfiles de la SSCP se visualizaron mediante tinción de los geles con plata (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) y las imágenes del gel se obtuvieron con un Densitómetro de Imagen Calibrado GS-800 (Biorad, El Prat de Llobregat, España).

#### **3.4.2. Análisis automatizado de los espacios intergénicos ribosomales (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, ARISA)**

En una de las pruebas experimentales se utilizó la técnica ARISA para analizar la diversidad bacteriana en pellets SAB y LAB aislados del rumen de las ovejas y de los fermentadores. Tras el procedimiento de desligamiento, se aisló el DNA de los pellets bacterianos (30 mg de MS) siguiendo la técnica descrita por Yu y Morrison (2004). El DNA extraído se amplificó usando los cebadores bacterianos universales 16S-1392f y 23S-125r (Danovaro *et al.*, 2006; sintetizados por Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, España), que amplifican la región en el operón ITS1 del rRNA. El cebador inverso fue marcado con el fluorocromo 6-FAM. Cada mezcla de PCR (50  $\mu$ L volumen final) contenía tampón de reacción de PCR 1X, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25  $\mu$ M de cada cebador, cada desoxinucleótido trifosfato en una concentración de 0,2 mM, y 2,5 U de Taq polimerasa (Biotools B&M Labs SA, Madrid, España). La PCR se realizó en un



termociclador 2720 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EEUU). Se inició con un ciclo de desnaturalización inicial (94°C, 240 s) seguido de 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 60 s), anillamiento (55°C, 60 s) y elongación (72°C, 120 s), con un paso final de extensión a 72°C durante 120 s. El tamaño y calidad de los productos de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, y fueron posteriormente purificados usando un kit Qiaquick PCR Purification (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El DNA eluído se cuantificó fluorométricamente usando un Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, DE, EEUU). Para cada ARISA, alrededor de 5 ng del amplicón se mezclaron con un estándar interno de tamaño (GS 1200 LIZ, Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) 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, EEUU) con un capilar 36 cm por 50 µm y el polímero POP-7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). El tamaño del pico y su área fueron estimados por comparación con el estándar interno de tamaño usando el software GeneMaker v1.80 (SoftGenetics, State College, PA, EEUU). Con el fin de incluir el máximo número de picos y estandarizar los electroferogramas, se utilizó un umbral de 100 unidades de fluorescencia. Se consideró que el perfil de los picos de los electroferogramas ARISA reflejó las especies o comunidades bacterianas predominantes presentes en las digestas y pellets bacterianos. Para analizar la representatividad de los pellets, se calculó un índice de similitud a partir del patrón del perfil de picos en el electroferograma de cada digesta y el correspondiente pellet aislado, considerando sólo la presencia/ausencia de los diferentes picos. Se calculó el índice de diversidad de Shannon tal y como describieron Shannon y Weaver (1949) para cada grupo de muestras (cada digesta y sus correspondientes pellets), y este índice fue utilizado para evaluar la diversidad de las comunidades bacterianas. Se construyeron dendrogramas usando el coeficiente de correlación de Pearson y el UPGMA en el software MVSP v3.12d (Kovach Computing Service, Anglesey, Gales, Reino Unido).



***Capítulo 4***  
***Pruebas experimentales***



## ***4.1. Prueba 1***

*Evolution of fermentation parameters in Rusitec  
fermenters operated at different dilution rate  
and concentrate retention times*



**Evolution of fermentation parameters in Rusitec  
fermenters operated at different dilution rates  
and concentrate retention times**

**M.E. Martínez, M.J. Ranilla, S. Ramos, M.L. Tejido and M.D.  
Carro**

*Departamento de Producción Animal, Universidad de León,  
24071 León (Spain)  
Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas  
s/n. 24346 Grulleros, León (Spain)*

(Aceptado para su publicación en *Options Méditerranéennes*)

**Abstract.** One 14-d incubation trial was carried out using 16 Rusitec fermenters to investigate the evolution of fermentation parameters with incubation day (ID) when fermenters were operated at different dilution rate (DL) and concentrate retention time (RT). The fermenters were fed a 30:70 alfalfa hay:concentrate diet, and the DL were 3.78 (LDL) and 5.42%/h (HDL). The concentrate RT was either 24 (T24) or 48 h (T48), and forage RT was 48 h in all fermenters. Significant ID x DL and ID x RT interactions ( $P < 0.05$ ) were observed for all the measured parameters with the exception of molar proportions of acetate. In general, fermenters operated at the HDL became stabilized before than LDL fermenters. Under the conditions of this study, 6 days were enough to reach steady values for most of the measured parameters.

**Keywords.** Rusitec – Fermentation Parameters – Adaptation Period – Dilution Rate – Retention Time

*Évolution des paramètres de fermentation actionnés au différent taux de dilution et temps de rétention du concentré*

**Résumé.** Une épreuve d'incubation de 14 jours a été effectuée utilisant 16 fermenteurs Rusitec pour étudier l'évolution des paramètres de fermentation au cours du temps quand les fermenteurs ont été actionnés au différent taux de dilution (DL) et temps de rétention du concentré (RT). Les fermenteurs ont été alimentés avec un régime 30:70 foin de luzern : concentré, et le DL étaient 3.78 (LDL) et 5.42%/h (HDL). Le RT était ou 24 (T24) ou 48 h (T48) et le fourrage RT 48 h dans tous les fermenteurs. Des interactions significatives ( $P < 0.05$ ) ID x DL et ID x RT ont été trouvées pour tous les paramètres mesurés à l'exception des proportions molaires d'acétate. En général, les fermenteurs opérés au plus haut HDL se sont stabilisés avant ceux LDL. Sous les conditions de cette étude, 6 jours ont été suffisants pour obtenir des valeurs stables dans la plupart des paramètres mesurés.

**Mots.clés.** Rusitec – Paramètres de Fermentation – Période d'Adaptation – Taux de Dilution – Temps de Rétention



## **I – Introduction**

Several types of artificial rumen apparatus have been described in the literature, the semi-continuous flow Rusitec system being one of the most widely used (Czerkawski and Breckenridge, 1977). Although Rusitec fermenters are used in many laboratories, there is no standardization regarding operating conditions such as adaptation period, dilution rate or amount of feed delivered daily (Boguhn *et al.*, 2008; Carro *et al.*, 2009). Regarding adaptation period, Czerkawski and Breckenridge (1977, 1979) pointed out that it was possible to achieve steady-state conditions in 4-6 days when balanced diets were administered to the fermenters, but longer adaptation periods were required for low-quality diets. Our hypothesis was that operating conditions such as dilution rate (DL) and solids retention time (RT) might affect the length of the adaptation period necessary to reach steady-state conditions. The objective of this study was, therefore, to analyze the evolution of fermentation variables with time in Rusitec fermenters operated at different DL and concentrate RT.

## **II – Materials and methods**

### **1. Apparatus, diet and experimental procedure**

One 14-day incubation trial was carried out with 16 Rusitec fermenters (Czerkawski and Breckenridge, 1977) with an effective volume of 600 mL each. On day 0, each fermenter was inoculated with 300 ml of rumen liquor, 200 ml of artificial saliva (pH = 8.4) and 80 g of solid rumen contents. Ruminant contents were obtained from four rumen-fistulated Merino sheep fed the same diet received by the fermenters. Ruminant contents from each sheep were collected immediately before the morning feeding, mixed, strained through two layers of cheesecloth, and transferred to the fermenters within 30 minutes after collection.

Each fermenter received once daily 30 g of DM of a diet consisting of 30% alfalfa hay and 70% concentrate (dry matter (DM) basis). Neutral-detergent fibre (NDF), acid-detergent fibre (ADF) and N of the diet was 359, 174 and 27.0 g/kg DM, respectively. Two nylon bags, one with 9 g of alfalfa hay and other with 21 g of concentrate, were incubated daily inside each fermenter. The experiment had a factorial design with two DL (low (LDL) and high (HDL)) and two concentrate RT of 24 (T24) and 48 h (T48).

Forage RT was 48 h in all fermenters. Treatments were assigned randomly so that four fermenters received each of the treatments. Flow through the fermenters was maintained by continuous infusion of artificial saliva (pH = 8.4) at two different rates of 545 (LDL; 3.78 %/h) and 780 (HDL; 5.42 %/h) mL/d. These DL and solids RT were chosen to resemble values previously observed *in vivo* in sheep (Carro *et al.*, 2000). The HDL fermenters received diluted saliva (70%) in order to infuse daily the same amount of salts in all fermenters and maintain similar pH values. The general incubation procedure was as described by Carro and Miller (1999).

## **2. Sampling, analytical procedures and statistical analyses**

Fermenters' fluid was sampled every day before the feeding and the pH was immediately measured. Liquid effluent was collected daily in flasks containing a solution of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20%; v:v) to maintain pH values below 2. Every day, total effluent was collected and the following samples were taken: One mL of effluent was added to 1 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. Procedures for determination of DM, N, NDF, ADF, VFA, ammonia-N and lactate have been reported by Carro and Miller (1999).

Data were analysed as a repeated measures model using the Proc MIXED procedure of SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC). Effects included in the model were DL, RT, incubation day (ID) and the interactions ID x DL, ID x RT, and DL x RT. When the effect of time was significant (P<0.05), differences between means were assessed by Tukey's test.

## **III – Results and discussion**

Because significant ID x DL or ID x RT interactions (P = 0.01 to < 0.001) were observed for all analyzed parameters, with the exception of daily production of total VFA (P = 0.37 and 0.25, respectively), the effects of ID were analyzed independently for each experimental treatment.

Previous studies have shown that modifications in the microbial populations are produced in fermenters over the incubation period (Slyter and Putnam, 1967; Prevot *et*

*al.*, 1994). A period of time is required for adaptation of microbes to the incubated diet and conditions of the system before starting to determine the fermentation parameters. Different adaptation periods have been used in previous studies, most of them ranging from 5 to 11 days (Czerkawski and Breckenridge, 1977, 1979; Carro and Miller, 1999; Godoy and Meschy, 2001; Jalc *et al.*, 2006; Giraldo *et al.*, 2007; Carro *et al.*, 2009), but to date there is no standardization regarding the number of days necessary for the microbial populations to be adapted to the fermenters' conditions. In this study, it was considered that steady-state conditions in the fermenters were reached when the daily output of fermentation products did not change significantly from day to day on several consecutive days.

**Table 4.1.1.** Effects of incubation day (ID) on daily production of volatile fatty acids (VFA), ammonia-N and lactate in Rusitec fermenters fed a 30:70 alfalfa hay:concentrate diet and operated at high (HDL) or low (LDL) dilution rate and concentrate retention times of 24 (T24) or 48 (T48) h

ID	VFA (mmol/d)				Ammonia-N (mg N/d)				Lactate (mg/d)			
	HDL		LDL		HDL		LDL		HDL		LDL	
	T24	T48	T24	T48	T24	T48	T24	T48	T24	T48	T24	T48
1	69.0 <sup>a</sup>	63.1 <sup>a</sup>	61.1 <sup>a</sup>	56.7 <sup>a</sup>	191	180 <sup>a</sup>	173 <sup>a</sup>	162 <sup>a</sup>	14.2 <sup>b</sup>	10.8	12.4 <sup>b</sup>	7.87 <sup>ab</sup>
2	78.4 <sup>ab</sup>	81.2 <sup>ab</sup>	66.5 <sup>ab</sup>	69.4 <sup>a</sup>	254	268 <sup>b</sup>	231 <sup>b</sup>	229 <sup>b</sup>	8.56 <sup>a</sup>	10.0	7.45 <sup>a</sup>	6.09 <sup>ab</sup>
3	78.9 <sup>abc</sup>	84.2 <sup>bc</sup>	77.8 <sup>abc</sup>	89.1 <sup>b</sup>	246	286 <sup>c</sup>	237 <sup>b</sup>	238 <sup>b</sup>	7.31 <sup>a</sup>	7.99	5.37 <sup>a</sup>	9.88 <sup>ab</sup>
4	81.0 <sup>abc</sup>	99.3 <sup>bc</sup>	81.3 <sup>bc</sup>	89.3 <sup>b</sup>	235	266 <sup>bc</sup>	225 <sup>b</sup>	230 <sup>b</sup>	12.4 <sup>ab</sup>	9.46	7.80 <sup>a</sup>	8.88 <sup>ab</sup>
5	86.8 <sup>bc</sup>	87.9 <sup>bc</sup>	82.0 <sup>bc</sup>	87.8 <sup>b</sup>	241	237 <sup>abc</sup>	210 <sup>ab</sup>	219 <sup>b</sup>	11.2 <sup>ab</sup>	9.86	9.32 <sup>ab</sup>	8.84 <sup>ab</sup>
6	83.8 <sup>abc</sup>	92.3 <sup>bc</sup>	78.2 <sup>bc</sup>	87.1 <sup>b</sup>	228	224 <sup>abc</sup>	187 <sup>ab</sup>	217 <sup>b</sup>	9.66 <sup>ab</sup>	10.6	6.55 <sup>a</sup>	7.51 <sup>ab</sup>
7	95.8 <sup>d</sup>	94.6 <sup>bc</sup>	82.5 <sup>bc</sup>	91.0 <sup>b</sup>	215	222 <sup>ab</sup>	190 <sup>ab</sup>	211 <sup>b</sup>	9.36 <sup>ab</sup>	10.5	6.35 <sup>a</sup>	5.83 <sup>ab</sup>
8	95.0 <sup>cd</sup>	102 <sup>c</sup>	87.5 <sup>c</sup>	87.7 <sup>b</sup>	223	253 <sup>bc</sup>	183 <sup>a</sup>	204 <sup>ab</sup>	10.3 <sup>ab</sup>	10.8	5.52 <sup>a</sup>	5.70 <sup>a</sup>
9	95.1 <sup>cd</sup>	100 <sup>c</sup>	83.1 <sup>bc</sup>	89.6 <sup>b</sup>	249	263 <sup>bc</sup>	172 <sup>a</sup>	201 <sup>a</sup>	8.74 <sup>a</sup>	9.29	6.56 <sup>a</sup>	6.86 <sup>ab</sup>
10	94.8 <sup>cd</sup>	98.3 <sup>bc</sup>	83.4 <sup>bc</sup>	88.3 <sup>b</sup>	218	237 <sup>abc</sup>	173 <sup>a</sup>	189 <sup>a</sup>	10.8 <sup>ab</sup>	11.3	8.88 <sup>ab</sup>	7.14 <sup>ab</sup>
11	96.0 <sup>d</sup>	97.6 <sup>bc</sup>	86.3 <sup>c</sup>	90.2 <sup>b</sup>	235	229 <sup>abc</sup>	185 <sup>a</sup>	191 <sup>ab</sup>	9.99 <sup>ab</sup>	9.94	9.52 <sup>ab</sup>	9.05 <sup>ab</sup>
12	94.3 <sup>cd</sup>	100 <sup>c</sup>	85.4 <sup>bc</sup>	92.9 <sup>b</sup>	238	223 <sup>ab</sup>	168 <sup>a</sup>	179 <sup>a</sup>	9.30 <sup>ab</sup>	9.07	9.08 <sup>ab</sup>	8.74 <sup>ab</sup>
13	92.9 <sup>bcd</sup>	95.3 <sup>bc</sup>	83.8 <sup>bc</sup>	88.6 <sup>b</sup>	223	241 <sup>b</sup>	174 <sup>a</sup>	184 <sup>a</sup>	8.92 <sup>ab</sup>	8.91	8.85 <sup>ab</sup>	8.39 <sup>ab</sup>
14	93.1 <sup>bcd</sup>	97.0 <sup>bc</sup>	87.4 <sup>c</sup>	92.2 <sup>b</sup>	215	253 <sup>b</sup>	176 <sup>a</sup>	183 <sup>a</sup>	9.60 <sup>ab</sup>	9.12	7.78 <sup>a</sup>	8.21 <sup>ab</sup>
SEM <sup>1</sup>	3.37	3.84	3.97	3.13	15.0	15.0	13.0	9.4	1.050	1.041	0.921	0.822
P =	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.01	<0.001	<0.001	<0.001	0.008	0.68	<0.001	0.01

a, b, c, d Mean values within a column with unlike superscripts differ (P<0.05)

<sup>1</sup> Standard error of the mean.

As shown in Table 4.1.1., daily production of total VFA was affected by ID ( $P < 0.001$ ) for all experimental treatments. In all fermenters, total VFA production increased over the first days, but no differences ( $P > 0.05$ ) were found among the last 8 days of incubation indicating that steady state conditions were achieved after 6 days of incubation. For all experimental treatments daily VFA production by the end of the incubation run was greater ( $P < 0.05$ ) than that observed on day 1. Daily ammonia-N production changed over time ( $P = 0.01$  to  $< 0.001$ ) for all experimental treatments. In general, values increased over the first ID, but then decreased gradually and the values found on the last 8 incubation days were similar ( $P > 0.05$ ) to those measured on day 1 in all fermenters (excepting HDL-T48 fermenters, which had greater ( $P < 0.05$ ) values on days 13 and 14). Daily production of lactate changed ( $P = 0.008$  to  $< 0.001$ ) with time in LDL fermenters and HDL-T24 fermenters, but no changes ( $P = 0.68$ ) were detected in HDL-T48 fermenters. The production of lactate was rather stable over the last 8 days in all fermenters, and the values were similar ( $P > 0.05$ ) to those found on day 2.

The molar proportions of acetate decreased ( $P < 0.05$ ) over the first 2 ID, but values were stable ( $P > 0.05$ ) from day 3 to 14 (Table 4.1.2.). In general, the molar proportions of propionate did not change ( $P > 0.05$ ) during the first 4 ID, but then decreased and became stable after 6 ID with the exception of LDL-T48 fermenters which needed 7 days to show steady values. The molar proportions of butyrate in HDL fermenters reached steady values ( $P > 0.05$ ) after 3 - 4 days, but a longer period of 7 - 8 days was required in LDL fermenters.

As shown in Table 4.1.3., acetate/propionate ratios were affected by ID ( $P < 0.001$ ) for all experimental treatments. The acetate/propionate ratios over the last 5 ID did not differ ( $P > 0.05$ ) from those on day 1 for T24 fermenters, but the values for T48 fermenters were greater ( $P < 0.05$ ) than those found on day 1. Over the first 4 ID, the molar proportions of other VFA (calculated as the sum of isobutyrate, isovalerate and valerate) increased ( $P < 0.001$ ) by about twice the values on day 1 for all treatments, but values became stable ( $P > 0.05$ ) by day 5 and 9 for HDL and LDL fermenters, respectively. The higher molar proportions of other VFA compared with the proportions usually found *in vivo* is in agreement with the results obtained previously in our laboratory (Gómez *et al.*, 2005; Giraldo *et al.*, 2007; Carro *et al.*, 2009).

**Table 4.1.2.** Effects of incubation day (ID) on molar proportions of acetate, propionate and butyrate in Rusitec fermenters fed a 30:70 alfalfa hay:concentrate diet and operated at high (HDL) or low (LDL) dilution rate and concentrate retention times of 24 (T24) or 48 (T48) h.

ID	Acetate (mol/100 mol)				Propionate (mol/100)				Butyrate (mol/100 mol)			
	HDL		LDL		HDL		LDL		HDL		LDL	
	T24	T48	T24	T48	T24	T48	T24	T48	T24	T48	T24	T48
1	51.9 <sup>c</sup>	52.4 <sup>b</sup>	53.8 <sup>c</sup>	53.9 <sup>d</sup>	23.6 <sup>c</sup>	23.8 <sup>c</sup>	23.7 <sup>cd</sup>	22.9 <sup>d</sup>	18.7 <sup>ab</sup>	18.0 <sup>ab</sup>	16.8 <sup>a</sup>	17.1 <sup>a</sup>
2	50.0 <sup>bc</sup>	47.9 <sup>ab</sup>	50.0 <sup>bc</sup>	48.9 <sup>c</sup>	24.2 <sup>c</sup>	25.8 <sup>c</sup>	24.4 <sup>cd</sup>	24.0 <sup>de</sup>	18.2 <sup>a</sup>	17.5 <sup>ab</sup>	17.5 <sup>a</sup>	17.6 <sup>a</sup>
3	47.0 <sup>abc</sup>	45.1 <sup>a</sup>	46.8 <sup>ab</sup>	44.6 <sup>bc</sup>	24.2 <sup>c</sup>	26.4 <sup>c</sup>	26.0 <sup>d</sup>	25.6 <sup>c</sup>	17.8 <sup>a</sup>	16.7 <sup>a</sup>	17.6 <sup>a</sup>	17.6 <sup>a</sup>
4	46.9 <sup>abc</sup>	44.2 <sup>a</sup>	47.3 <sup>ab</sup>	43.1 <sup>b</sup>	23.5 <sup>bc</sup>	24.1 <sup>c</sup>	24.3 <sup>cd</sup>	23.5 <sup>d</sup>	17.7 <sup>a</sup>	18.3 <sup>ab</sup>	17.0 <sup>a</sup>	18.5 <sup>a</sup>
5	46.7 <sup>abc</sup>	43.4 <sup>a</sup>	45.8 <sup>ab</sup>	41.5 <sup>ab</sup>	21.5 <sup>b</sup>	20.8 <sup>b</sup>	21.0 <sup>bc</sup>	20.3 <sup>c</sup>	18.4 <sup>ab</sup>	19.4 <sup>ab</sup>	18.3 <sup>ab</sup>	19.9 <sup>b</sup>
6	46.3 <sup>ab</sup>	45.5 <sup>a</sup>	45.5 <sup>a</sup>	46.6 <sup>bc</sup>	18.9 <sup>a</sup>	17.2 <sup>a</sup>	17.9 <sup>ab</sup>	15.2 <sup>b</sup>	19.8 <sup>ab</sup>	19.6 <sup>ab</sup>	20.8 <sup>bc</sup>	18.3 <sup>a</sup>
7	45.2 <sup>ab</sup>	45.8 <sup>a</sup>	46.4 <sup>ab</sup>	46.0 <sup>bc</sup>	18.4 <sup>a</sup>	16.8 <sup>a</sup>	15.8 <sup>a</sup>	12.7 <sup>a</sup>	21.0 <sup>ab</sup>	20.2 <sup>ab</sup>	21.2 <sup>c</sup>	19.4 <sup>b</sup>
8	46.0 <sup>ab</sup>	45.0 <sup>a</sup>	44.9 <sup>a</sup>	45.6 <sup>bc</sup>	18.5 <sup>a</sup>	16.0 <sup>a</sup>	16.0 <sup>a</sup>	12.2 <sup>a</sup>	20.8 <sup>ab</sup>	20.7 <sup>b</sup>	21.6 <sup>c</sup>	20.3 <sup>b</sup>
9	47.0 <sup>abc</sup>	45.2 <sup>a</sup>	43.0 <sup>a</sup>	45.6 <sup>bc</sup>	18.5 <sup>a</sup>	16.8 <sup>a</sup>	16.5 <sup>a</sup>	12.9 <sup>a</sup>	20.3 <sup>ab</sup>	20.1 <sup>ab</sup>	21.7 <sup>c</sup>	20.0 <sup>b</sup>
10	44.0 <sup>a</sup>	45.5 <sup>a</sup>	44.0 <sup>a</sup>	45.9 <sup>bc</sup>	20.8 <sup>b</sup>	17.8 <sup>a</sup>	17.2 <sup>ab</sup>	13.0 <sup>a</sup>	21.4 <sup>ab</sup>	19.5 <sup>ab</sup>	21.0 <sup>b</sup>	20.4 <sup>b</sup>
11	43.0 <sup>a</sup>	44.3 <sup>a</sup>	44.0 <sup>a</sup>	45.6 <sup>bc</sup>	21.2 <sup>b</sup>	16.7 <sup>a</sup>	17.7 <sup>ab</sup>	12.5 <sup>a</sup>	22.0 <sup>b</sup>	20.5 <sup>b</sup>	22.1 <sup>c</sup>	21.5 <sup>b</sup>
12	44.4 <sup>a</sup>	44.6 <sup>a</sup>	45.2 <sup>a</sup>	45.3 <sup>bc</sup>	19.9 <sup>ab</sup>	16.2 <sup>a</sup>	17.9 <sup>ab</sup>	13.2 <sup>a</sup>	21.4 <sup>ab</sup>	20.4 <sup>b</sup>	20.8 <sup>b</sup>	21.8 <sup>b</sup>
13	44.9 <sup>ab</sup>	44.8 <sup>a</sup>	44.5 <sup>a</sup>	46.2 <sup>bc</sup>	18.9 <sup>a</sup>	15.6 <sup>a</sup>	17.5 <sup>ab</sup>	12.8 <sup>a</sup>	21.4 <sup>ab</sup>	19.1 <sup>ab</sup>	19.8 <sup>ab</sup>	20.3 <sup>b</sup>
14	44.3 <sup>a</sup>	46.0 <sup>a</sup>	43.0 <sup>a</sup>	45.6 <sup>bc</sup>	19.0 <sup>a</sup>	16.2 <sup>a</sup>	18.0 <sup>ab</sup>	13.2 <sup>a</sup>	21.8 <sup>b</sup>	19.1 <sup>ab</sup>	20.4 <sup>b</sup>	21.3 <sup>b</sup>
SEM <sup>1</sup>	1.06	1.07	0.88	0.97	0.41	0.58	0.79	0.39	0.75	0.73	0.63	0.48
P =	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.007	<0.001	<0.001

<sup>a, b, c</sup> Mean values within a column with unlike superscripts differ (P<0.05)

<sup>1</sup> Standard error of the mean.

The molar proportions of caproate increased rapidly over the first ID, but became stable after 5 days in all fermenters. The values found over the last 4 ID were 6.3, 13.9, 13.3 and 15.5 times greater than those observed on day 1 for HDL-T24, HDL-T48, LDL-T24 and LDL-T48 fermenters, respectively. These results seem to indicate that the unphysiologically high caproate concentrations found in Rusitec fermenters fed high-concentrate diets (Gómez *et al.*, 2005; Carro *et al.*, 2009) might have been due to the high RT of concentrate feeds (48 h in all the cited experiments) and to the low DL (about 3.8%/h). This would indicate that using higher DL and shorter concentrate RT than those typically used in Rusitec fermenters would contribute to reduce this abnormally high production of caproate.

**Table 4.1.3.** Effects of incubation day (ID) on acetate:propionate ratio (Ac/Pr) and molar proportions of other VFA<sup>1</sup> and caproate in Rusitec fermenters fed a 30:70 alfalfa hay:concentrate diet and operated at high (HDL) or low (LDL) dilution rate and concentrate retention times of 24 (T24) or 48 (T48) h

ID	Ac/Pr (mol/mol)				Other VFA (mol/100)				Caproate (mol/100 mol)			
	HDL		LDL		HDL		LDL		HDL		LDL	
	T24	T48	T24	T48	T24	T48	T24	T48	T24	T48	T24	T48
1	2.20 <sup>abc</sup>	2.20 <sup>ab</sup>	2.28 <sup>abc</sup>	2.35 <sup>b</sup>	5.05 <sup>a</sup>	5.15 <sup>a</sup>	5.02 <sup>a</sup>	5.27 <sup>a</sup>	0.67 <sup>a</sup>	0.71 <sup>a</sup>	0.71 <sup>a</sup>	0.82 <sup>a</sup>
2	2.07 <sup>ab</sup>	1.87 <sup>a</sup>	2.05 <sup>ab</sup>	2.04 <sup>ab</sup>	5.74 <sup>ab</sup>	6.42 <sup>ab</sup>	5.91 <sup>ab</sup>	6.87 <sup>ab</sup>	1.98 <sup>ab</sup>	2.43 <sup>ab</sup>	1.88 <sup>ab</sup>	2.62 <sup>ab</sup>
3	1.95 <sup>a</sup>	1.71 <sup>a</sup>	1.80 <sup>a</sup>	1.74 <sup>a</sup>	7.51 <sup>c</sup>	7.87 <sup>bc</sup>	6.78 <sup>bc</sup>	8.05 <sup>bc</sup>	3.54 <sup>bc</sup>	3.89 <sup>bc</sup>	2.87 <sup>abc</sup>	4.19 <sup>abc</sup>
4	2.00 <sup>ab</sup>	1.84 <sup>a</sup>	1.95 <sup>ab</sup>	1.84 <sup>ab</sup>	8.37 <sup>cd</sup>	8.87 <sup>cd</sup>	7.85 <sup>cd</sup>	9.25 <sup>cd</sup>	3.64 <sup>c</sup>	4.58 <sup>bcd</sup>	3.56 <sup>abcc</sup>	5.64 <sup>bc</sup>
5	2.18 <sup>abc</sup>	2.09 <sup>ab</sup>	2.19 <sup>abc</sup>	2.05 <sup>ab</sup>	9.57 <sup>de</sup>	10.5 <sup>e</sup>	9.73 <sup>e</sup>	10.5 <sup>de</sup>	3.87 <sup>c</sup>	5.90 <sup>cde</sup>	5.17 <sup>abc</sup>	7.75 <sup>cd</sup>
6	2.46 <sup>cd</sup>	2.66 <sup>bc</sup>	2.56 <sup>c</sup>	3.08 <sup>c</sup>	10.6 <sup>e</sup>	10.6 <sup>e</sup>	9.71 <sup>e</sup>	10.2 <sup>de</sup>	4.54 <sup>c</sup>	7.13 <sup>def</sup>	5.07 <sup>bcde</sup>	9.68 <sup>de</sup>
7	2.47 <sup>cd</sup>	2.78 <sup>c</sup>	2.95 <sup>cd</sup>	3.62 <sup>cd</sup>	10.6 <sup>e</sup>	9.79 <sup>de</sup>	9.29 <sup>de</sup>	9.88 <sup>de</sup>	4.85 <sup>c</sup>	7.39 <sup>ef</sup>	7.40 <sup>cde</sup>	12.0 <sup>e</sup>
8	2.49 <sup>cd</sup>	2.85 <sup>c</sup>	2.85 <sup>cd</sup>	3.74 <sup>d</sup>	10.3 <sup>e</sup>	10.4 <sup>de</sup>	9.63 <sup>e</sup>	9.70 <sup>de</sup>	4.39 <sup>c</sup>	7.96 <sup>ef</sup>	7.91 <sup>de</sup>	12.2 <sup>e</sup>
9	2.56 <sup>cd</sup>	2.73 <sup>c</sup>	2.62 <sup>c</sup>	3.61 <sup>cd</sup>	10.1 <sup>e</sup>	9.80 <sup>de</sup>	9.34 <sup>de</sup>	8.74 <sup>cd</sup>	4.13 <sup>c</sup>	8.20 <sup>ef</sup>	9.57 <sup>de</sup>	12.7 <sup>e</sup>
10	2.12 <sup>ab</sup>	2.59 <sup>bc</sup>	2.57 <sup>c</sup>	3.54 <sup>cd</sup>	10.0 <sup>e</sup>	9.40 <sup>cde</sup>	8.28 <sup>cd</sup>	8.20 <sup>bc</sup>	3.85 <sup>c</sup>	8.05 <sup>ef</sup>	9.48 <sup>de</sup>	12.5 <sup>e</sup>
11	2.03 <sup>a</sup>	2.66 <sup>bc</sup>	2.54 <sup>bc</sup>	3.66 <sup>d</sup>	10.1 <sup>e</sup>	9.62 <sup>de</sup>	7.79 <sup>cd</sup>	8.11 <sup>bc</sup>	3.68 <sup>c</sup>	8.87 <sup>fg</sup>	8.35 <sup>de</sup>	12.4 <sup>e</sup>
12	2.23 <sup>abc</sup>	2.76 <sup>c</sup>	2.57 <sup>c</sup>	3.44 <sup>c</sup>	10.3 <sup>e</sup>	9.13 <sup>cde</sup>	7.62 <sup>cd</sup>	7.34 <sup>bc</sup>	3.93 <sup>c</sup>	9.65 <sup>fg</sup>	8.58 <sup>de</sup>	12.4 <sup>e</sup>
13	2.37 <sup>bcd</sup>	2.88 <sup>c</sup>	2.59 <sup>c</sup>	3.62 <sup>cd</sup>	10.2 <sup>e</sup>	9.21 <sup>cde</sup>	8.92 <sup>de</sup>	7.48 <sup>bc</sup>	4.62 <sup>c</sup>	11.3 <sup>g</sup>	9.83 <sup>de</sup>	13.3 <sup>e</sup>
14	2.33 <sup>bcd</sup>	2.84 <sup>c</sup>	2.42 <sup>bc</sup>	3.47 <sup>d</sup>	10.3 <sup>e</sup>	9.24 <sup>cde</sup>	8.41 <sup>de</sup>	7.08 <sup>bc</sup>	4.68 <sup>c</sup>	9.53 <sup>fg</sup>	10.1 <sup>e</sup>	12.9 <sup>e</sup>
SEM <sup>2</sup>	0.075	0.118	0.126	0.105	0.268	0.334	0.317	0.358	0.326	0.515	0.946	0.729
P =	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

a, b, c, d, e, f, g Mean values within a column with unlike superscripts differ (P<0.05)

<sup>1</sup> Calculated as the sum of isobutyrate, isovalerate and valerate.

<sup>2</sup> Standard error of the mean.

#### IV – Conclusions

Under the conditions of the present study, most of the fermentation parameters reached steady values after 6 days of incubation, and the values for the majority of them were different from those observed in the fermenters over the first 2 days of incubation. In general, the fermenters operated at the high DL became stabilized before than those operated at the low DL. The results indicate that using higher DL and shorter concentrate RT than those typically used in Rusitec fermenters would contribute to reduce the acetate/propionate ratio and the production of caproate.

#### References

Boguhn, J., Strobel, E., Witzig, M., Tebbe, C. C. and Rodehutsord, M. 2008. Description of the structural diversity of rumen microbial communities *in vitro* using

- single-strand conformation polymorphism profiles. *Arch. Anim. Nutr.*, 62. p. 454–467.
- Carro, M. D. and Miller, E. L. 1999. Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semicontinuous culture system (Rusitec). *Br. J. Nutr.*, 82. p. 149-157.
- 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 offered food at a fixed and restricted level of intake. *Anim. Sci.*, 70. p. 127-134.
- Carro, M. D., Ranilla, M. J., Martín-García, A. I. and Molina-Alcaide, E. 2009. Comparison of microbial fermentation of high- and low-forage diets in Rusitec single-flow continuous-culture fermenters and sheep rumen. *Animal*, 3. p. 527-534.
- Czerkawski, J.W. and Breckenridge, G. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.*, 38. p. 371-384.
- Czerkawski, J.W. and Breckenridge, G. 1979. Experiments with the long-term rumen simulation technique (Rusitec); response to supplementation of basal rations. *Br. J. Nutr.*, 42. p. 217-228.
- Giraldo, L. A., Tejido, M. L., Ranilla, M. J. and Carro, M. D. 2007. Effect of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in Rusitec fermenters. *J. Anim. Sci.*, 85. p. 1962-1970.
- Godoy, S. and Meschy, F. 2001. Utilisation 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.*, 41. p. 259-265.
- Gómez, J. A., Tejido, M. L. and Carro, M. D. 2005. Mixed rumen micro-organisms growth and rumen fermentation of two diets in Rusitec fermenter: influence of disodium malate supplementation. *Br. J. Nutr.*, 93. p. 479-484.
- Jalc, D., Potkanski, A., Szumacher-Strabel, M., Kowalczyk, J. and Cieslak, A. 2006. The effect of a forage diet and different fat sources on rumen fermentation *in vitro*. *J. Anim. Feed Sci.*, 15. p. 129-132.
- 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). *Zool. Sci.*, 11. p. 871-882.
- Slyter, L. L. and Putnam, P. A. 1967. *In vivo* vs. *in vitro* continuous culture of ruminal microbial populations. *J. Anim. Sci.*, 26. p. 1421-1427.





## ***4.2. Prueba 2***

*Protozoa evolution in Rusitec fermenters fed diets differing in forage:concentrate ratio and forage type*



**Protozoa evolution in Rusitec fermenters fed  
diets differing in forage:concentrate ratio and  
forage type**

M.E. Martínez, M.J. Ranilla, S. Ramos, M.L. Tejido

and M.D. Carro

*Departamento de Producción Animal, Universidad de León,  
24071 León (Spain)  
Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas  
s/n. 24346 Grulleros, León (Spain)*

**(Aceptado para su publicación en *Options Méditerranéennes*)**



**Abstract.** The aim of this study was to investigate the evolution of protozoa numbers over 14 days in 16 Rusitec fermentors fed four different diets. The diets had forage:concentrate (F:C;dry matter (DM) basis) ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) with either alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage. Ruminal inoculum from sheep fed the same diets was used to inoculate the fermentors on day 0. Retention time for forage and concentrate was 48 and 24 h, respectively, and dilution rate was preset at 5.14 % per h. Total protozoa numbers declined rapidly from the first day after inoculation, but they were present on day 14 in all fermentors at concentrations which ranged from 3.30 to  $8.52 \times 10^3$  / mL. Only Entodiniinae were able to grow in HC-fed fermentors by the end of the trial, but Entodiniinae, Isotrichidae and Diplodiniinae were maintained in fermentors receiving HF diets. The disappearance of Isotrichidae and Diplodiniinae from HC-fed fermentors was attributed to low pH values. Ophryoscolecinae disappeared completely from all fermentors by day 6 of incubation. In general, greater protozoa numbers were observed in the fermentors fed diets containing G compared with those fed A diets. Our results indicate that protozoa could not be maintained at numbers similar to those in the rumen, but responses to changes in F:C ratio in the diet were similar to those observed *in vivo*.

**Keywords.** Rusitec – Protozoa – Forage:Concentrate Ratio – Forage.

***Évolution des protozoaires dans des fermenteurs Rusitec alimentés avec régimes différents dans leur rapport fourrage: concentré et le type du fourrage.***

**Résumé.** Le but de cette étude était d'étudier l'évolution des nombres des protozoaires au cours de 14 jours dans 16 fermenteurs Rusitec alimentés quatre régimes différents. Les régimes ont eu un rapport fourrage : concentré (F: C ; rapports en base de la matière sèche (DM)) du 70: 30 (HF) ou du 30: 70 (HC) avec le foin de luzerne (A) ou le foin d'herbe (G) comme fourrage. L'inoculum ruminal des moutons alimentés les mêmes régimes a été employé pour inoculer les fermenteurs le jour 0. Le temps de rétention pour le fourrage et le concentré était 48 et 24 h, respectivement, et le taux de dilution a été pré-réglé à 5.14 % par h. Les nombres totaux de protozoaires ont rapidement décliné depuis le premier jour après la l'inoculation, mais ils étaient présents le jour 14 dans tous les fermenteurs aux concentrations comprises entre 3.30 et  $8.52 \times 10^3$ /mL. Seulement les Entodiniinae pouvaient se développer dans les fermenteurs HC vers la fin de l'expérience, mais les Entodiniinae, Isotrichidae et Diplodiniinae ont été maintenus

dans les fermenteurs recevant des régimes HF. La disparition des *Isotrichidae* et des *Diplodiniinae* des fermenteurs HC a été attribuée aux faibles valeurs de pH. Les *Ophryoscolecinae* ont complètement disparu de tous les fermenteurs par le jour 6 de l'incubation. En général, on a trouvé des nombres plus grands de protozoaires dans les fermenteurs qui contenaient G comparés avec ceux nourris avec A. Nos résultats indiquent qu'on n'a pas pu maintenir les protozoaires dans des nombres semblables à ceux qui se trouvent dans le rumen, mais les réponses aux changements dans le rapport F: C ont été semblables à ceux observés *in vivo*.

**Mots.clés.:** *Rusitec – Protozoaires – Fourrage : Concentré Rapport – Fourrage.*

## **I – Introduction**

Research on rumen function *in vivo* is mostly carried out with surgically altered (i.e. fistulated animals), which are expensive and difficult to maintain; additionally, in the last years, ethical questions have been raised concerning the use of fistulated animals for experimental purposes. *In vitro* devices simulating rumen fermentation are a good alternative, but in many *in vitro* experiments with continuous-flow fermentors a marked decrease or even a complete disappearance of protozoa with time has been reported (Crawford *et al.*, 1980; Moumen *et al.*, 2007). The semi-continuous flow Rusitec system (Czerkwaski and Breckenridge, 1977) could be more appropriated than continuous-flow fermentors, since solid substrate is enclosed in nylon bags instead of being dispersed by stirring. Dietary factors, such as forage: concentrate (F:C) ratio, forage quality and level of feeding, have been reported to influence protozoa populations *in vivo* (Jouany, 1989), but few studies have been conducted to determine how these factors affect protozoa populations in fermentors over incubation time. The aim of this work was to investigate the evolution of protozoa populations over time in Rusitec fermentors fed four diets differing in F:C ratio and forage type.

## **II – Materials and methods**

One 14-day incubation trial was carried out with 16 Rusitec fermentors with an effective volume of 600 mL each. Four total mixed diets were formulated according to a 2 × 2 factorial arrangement of treatments. The diets had F:C (dry matter (DM) basis) ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) with either alfalfa hay (A) or grass hay (G) as

forage, and were designated as HFA, HCA, HFG and HCG. The concentrate was based on barley, gluten feed, wheat middlings, soybean meal, palmkern meal, wheat, corn and mineral-vitamin premix in the proportions of 215, 204, 200, 135, 115, 50, 50 and 31 g/kg, respectively (fresh matter basis). Crude protein content was 186, 177, 121 and 160 g/kg DM for HFA, HCA, HFG and HCG, respectively, and neutral-detergent content was 426, 374, 499 and 401 g/kg DM. Eight rumen-fistulated sheep were used as donors of ruminal inoculum. Two sheep received each of the diet for 21 days before starting the *in vitro* trial. Ruminal contents from each sheep were collected before the morning feeding, pooled by diet, strained through two layers of cheesecloth, and transferred to the corresponding fermentors within 30 minutes after collection. The flow through fermentors was maintained by continuous infusion of artificial saliva at a rate of 740 mL/d (5.14 % h<sup>-1</sup>). Each fermentor received daily 30 g (DM) of the corresponding diet. Forage and concentrate were incubated into separated nylon bags (100 µm of pore size), which remained inside the fermentors for 48 and 24 h, respectively. The general incubation procedure was as described by Carro *et al.* (1992). Fermentors' fluid was sampled every day before the morning feeding and the pH was immediately measured. On days 0, 4, 6, 8, 10, 12 and 14, 2 mL of ruminal fluid were added to 2 mL of 50% formalin solution (18.5% formaldehyde), mixed, and stored at room temperature in dark. Aliquots were counted by duplicate from 10 microscopic fields in a Hausser Nageotte Bright-line counting chamber (0.5 mm depth; Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) at a magnification of 40X. Family Isotrichidae and Family Ophryoscolecidae (including subfamilies Entodiniinae, Diplodiniinae and Ophryoscolecinae) were identified following descriptions by Dehority (1993), and their numbers were separately recorded. When coefficient of variation between replicates was greater than 10%, counting was repeated.

Data were analyzed according to a repeated measures model using the MIXED procedure of the Statistical Analysis Systems statistical package version 8.02 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Effects included in the model were time, F:C ratio, forage type (FOR), and the interactions F:C x FOR, F:C x time and FOR x time. Fermentor was considered a random effect. Mean effects were declared significant at  $P < 0.05$ , and when a significant effect of time was detected differences between means were assessed by using the Tukey's multiple comparison test.

### III – Results and discussion

As shown in Table 4.2.1., total protozoa numbers declined ( $P < 0.001$ ) rapidly from the first day after inoculation, but they were present in all fermentors 14 days after inoculation. Total protozoa numbers were greater for HC than for HF diets ( $P < 0.001$ ), and for G compared with A diets ( $P < 0.001$ ). Concentrations of protozoa at the end of the trial were within the range found in studies with Rusitec fermentors conducted under similar conditions (Czerkawski and Breckenridge, 1977; Carro *et al.*, 1992; Carro *et al.*, 1995).

**Table 4.2.1.** Total protozoa numbers ( $\times 10^3/\text{mL}$ ) in Rusitec fermentors fed diets with forage:concentrate (F:C) ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage (FOR) and inoculated on day 0 with buffered rumen fluid from sheep ( $n = 4$ )

Day	Diet				SEM <sup>1</sup>	Statistical effect ( $P =$ )					
	HFA	HFG	HCA	HCG		F:C	FOR	Time	F:C x FOR	F:C x Time	FOR x Time
0	463 <sup>a</sup>	392 <sup>a</sup>	826 <sup>a</sup>	598 <sup>a</sup>	3.141	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
2	73.4 <sup>b</sup>	115 <sup>b</sup>	77.7 <sup>b</sup>	103 <sup>b</sup>							
4	35.4 <sup>c</sup>	63.3 <sup>c</sup>	40.4 <sup>c</sup>	45.2 <sup>c</sup>							
6	26.1 <sup>d</sup>	37.1 <sup>d</sup>	19.7 <sup>d</sup>	26.0 <sup>d</sup>							
8	19.3 <sup>de</sup>	26.5 <sup>e</sup>	13.2 <sup>de</sup>	12.0 <sup>e</sup>							
10	15.3 <sup>ef</sup>	15.9 <sup>f</sup>	6.80 <sup>ef</sup>	9.73 <sup>e</sup>							
12	8.00 <sup>fg</sup>	9.10 <sup>f</sup>	2.91 <sup>f</sup>	9.15 <sup>e</sup>							
14	6.14 <sup>g</sup>	8.52 <sup>f</sup>	3.30 <sup>f</sup>	6.76 <sup>e</sup>							

a, b, c, d, e, f, g Mean values within a column with unlike superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Standard error of the mean.

Dilution rates in the rumen are usually over 1.0 per day, but when similar or greater dilution rates are used in continuous-flow fermentors protozoa numbers decrease markedly, since their generation time becomes greater than the residence one (Abe and Kumeno, 1973; Czerkawski and Breckenridge 1977). In our experiment, liquid dilution rate was 1.20 per day, which would explain the pronounced decrease of protozoa. Low dilution rates have been reported to decrease the washing out of protozoa from the fermentors (Crawford *et al.*, 1980), but they might lead to an accumulation of end-products toxic to microbial populations.

Isotrichidae protozoa numbers declined drastically from the start of the trial, and concentrations at day 8 of incubation were only 2.4 and 0.65 % of those in the inoculum



for HF and HC diets, respectively (Table 4.2.2.). Isotrichidae disappeared completely in the fermentors fed HC diets by day 10, whereas they were maintained in HF-fed fermentors until the end of the trial. Studying the establishment of protozoa in calves and sheep, Eadie (1962) found that Isotrichidae did not develop with pH below 6.5. Thus, the complete disappearance of Isotrichidae in HC-fed fermentors may be pH related. Minimum pH values were observed in all fermentors between 6 and 8 h after feeding (results not shown). Whereas in HF-fed fermentors values did not drop below 6.44 and 6.11 in fermentors fed HFA and HFG, respectively, minimum values were 5.76 and 5.74 in fermentors fed HCA and HCG, respectively. In agreement with our results, Carro *et al.* (1995) found that Isotrichidae represented 1.35 % of total protozoa in Rusitec fermentors fed a HF diet at pH values of 6.36, but they completely disappeared when pH dropped to 6.17, and Carro *et al.* (1992) found that Isotrichidae were 12.2 % of total protozoa in Rusitec fermentors fed the same diet and maintained at pH = 6.86. The greater ( $P = 0.03$ ) Isotrichidae numbers observed for A diets compared with G diets might also be pH related, as pH mean values over the 12 h after feeding period were 6.43 and 6.17, respectively.

**Table 4.2.2.** Isotrichidae protozoa numbers ( $\times 10^3/\text{mL}$ ) in Rusitec fermentors fed diets with forage:concentrate (F:C) ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage (FOR) and inoculated on day 0 with buffered rumen fluid from sheep ( $n = 4$ )

Day	Diet				SEM <sup>1</sup>	Statistical effect ( $P =$ )					
	HFA	HFG	HCA	HCG		F:C	FOR	Time	F:C x FOR	F:C x Time	FOR x Time
0	47.2 <sup>a</sup>	46.3 <sup>a</sup>	29.6 <sup>a</sup>	31.3 <sup>a</sup>	0.276	<0.001	0.03	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
2	7.29 <sup>b</sup>	7.48 <sup>b</sup>	7.85 <sup>b</sup>	9.08 <sup>b</sup>							
4	4.54 <sup>c</sup>	4.08 <sup>c</sup>	4.84 <sup>c</sup>	3.79 <sup>c</sup>							
6	3.18 <sup>d</sup>	1.84 <sup>d</sup>	1.14 <sup>d</sup>	1.42 <sup>d</sup>							
8	1.86 <sup>e</sup>	0.42 <sup>e</sup>	0.24 <sup>e</sup>	0.15 <sup>e</sup>							
10	1.62 <sup>e</sup>	0.12 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>							
12	0.22 <sup>f</sup>	0.10 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>							
14	0.11 <sup>f</sup>	0.03 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>							

a, b, c, d, e, f Mean values within a column with unlike superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Standard error of the mean.

Entodiniinae numbers declined ( $P < 0.001$ ) rapidly from the inoculation level, but they were present 14 days after inoculation in all fermentors (Table 4.2.3.). This is in agreement with other studies (Slyter and Putnam, 1967; Carro *et al.*, 1992, 1995)

showing that Entodiniinae are the most abundant protozoa in fermentors. Entodiniinae numbers were greater ( $P < 0.001$ ) in HC-fed fermentors than in those receiving HF diets. Entodiniinae have been reported to utilize starch and to be the most resistant of the protozoa to low ruminal pH, and therefore they are usually the most abundant protozoa in the rumen of animals given HC diets (Williams and Coleman, 1992; Hristov *et al.*, 2001). In agreement with the results from other studies (Franzolin and Dehority, 1996; Hristov *et al.*, 2001), Entodiniinae represented 83 and 90 % of total protozoa in the rumen fluid from sheep fed HF and HC diets, respectively. The proportion of Entodiniinae increased ( $P < 0.001$ ) with time, and by the end of the trial it was 94, 99, 100 and 100 % in fermentors fed HFA, HFG, HCA and HCG, respectively. Both Entodiniinae numbers and their proportion of total protozoa were greater ( $P = 0.03$  and  $< 0.001$ , respectively) in fermentors receiving G diets than in those fed A diets.

**Table 4.2.3.** Entodiniinae protozoa numbers ( $\times 10^3/\text{mL}$ ) in Rusitec fermentors fed diets with forage:concentrate (F:C) ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage (FOR) and inoculated on day 0 with buffered rumen fluid from sheep ( $n = 4$ )

Day	Diet				SEM <sup>1</sup>	Statistical effect ( $P =$ )					
	HFA	HFG	HCA	HCG		F:C	FOR	Time	F:C $\times$ FOR	F:C $\times$ Time	FOR $\times$ Time
0	387 <sup>a</sup>	326 <sup>a</sup>	744 <sup>a</sup>	534 <sup>a</sup>	2.884	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
2	61.8 <sup>b</sup>	102 <sup>b</sup>	66.9 <sup>b</sup>	86.9 <sup>b</sup>							
4	28.5 <sup>cd</sup>	56.1 <sup>c</sup>	33.8 <sup>c</sup>	38.5 <sup>c</sup>							
6	20.9 <sup>de</sup>	33.2 <sup>d</sup>	18.2 <sup>d</sup>	23.2 <sup>d</sup>							
8	16.4 <sup>e</sup>	25.0 <sup>e</sup>	12.7 <sup>de</sup>	11.1 <sup>e</sup>							
10	13.0 <sup>e</sup>	15.3 <sup>f</sup>	6.73 <sup>ef</sup>	9.73 <sup>e</sup>							
12	7.47 <sup>f</sup>	8.80 <sup>f</sup>	2.91 <sup>f</sup>	9.15 <sup>e</sup>							
14	5.79 <sup>f</sup>	8.43 <sup>f</sup>	3.30 <sup>f</sup>	6.76 <sup>e</sup>							

a, b, c, d, e, f Mean values within a column with unlike superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Standard error of the mean.

Mean retention time of solid digesta in our study was 48 and 24h for forage and concentrate, respectively. This long retention time could help to explain the presence of Entodiniinae in all fermentors for 14 days, because the sequestration of protozoa among particulate digesta has been identified as an important factor in maintaining their concentration (Nakamura and Kurihara, 1978). Crawford *et al.* (1980) reported that continuous-flow fermentors with a solid digesta retention time of 29.7 h maintained relatively stable protozoa numbers after 8 days of incubation, but the reduction of solid

digesta retention time to 22.0 and 14.3 h produced a marked decline in protozoa numbers.

As shown in Table 4.2.4., Diplodiniinae numbers declined ( $P < 0.001$ ) rapidly, and they disappeared completely from fermentors receiving HC diets by day 10. These observations are in accordance with the results of Franzolin and Dehority (1996), Goad et al. (1998) and Hristov *et al.* (2001), who observed that Diplodiniinae disappeared from the rumen when steers were fed HC diets. The disappearance of Diplodiniinae was attributed to their sensitivity to low ruminal pH.

**Table 4.2.4.** Diplodiniinae protozoa numbers ( $\times 10^3/\text{mL}$ ) in Rusitec fermentors fed diets with forage:concentrate (F:C) ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage (FOR) and inoculated on day 0 with buffered rumen fluid from sheep ( $n = 4$ )

Day	Diet				SEM <sup>1</sup>	Statistical effect ( $P =$ )					
	HFA	HFG	HCA	HCG		F:C	FOR	Time	F:C x FOR	F:C x Time	FOR x Time
0	21.2 <sup>a</sup>	18.9 <sup>a</sup>	41.7 <sup>a</sup>	26.3 <sup>a</sup>	0.17	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
2	2.20 <sup>b</sup>	2.69 <sup>b</sup>	1.20 <sup>b</sup>	3.24 <sup>b</sup>							
4	1.33 <sup>c</sup>	1.77 <sup>c</sup>	0.91 <sup>b</sup>	1.58 <sup>c</sup>							
6	1.20 <sup>c</sup>	1.26 <sup>d</sup>	0.20 <sup>c</sup>	0.80 <sup>d</sup>							
8	0.65 <sup>d</sup>	0.65 <sup>e</sup>	0.14 <sup>c</sup>	0.42 <sup>de</sup>							
10	0.39 <sup>de</sup>	0.27 <sup>ef</sup>	0.04 <sup>c</sup>	0.00 <sup>e</sup>							
12	0.18 <sup>de</sup>	0.10 <sup>f</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>e</sup>							
14	0.15 <sup>e</sup>	0.04 <sup>f</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>e</sup>							

a, b, c, d, e Mean values within a column with unlike superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Standard error of the mean.

Ophryoscolecinae protozoa numbers (results not shown) were affected by all analysed factors ( $P < 0.001$ ) and disappeared completely from all fermentors by day 6 of incubation. Dehority (2004) estimated that the *in vitro* generation time of *Ophryoscolex purkynjei* was 29 h, but generation times of 2-3 days have reported by other authors (Sylvester *et al.*, 2009). Williams *et al.* (1961) reported that dimensions for *Ophryoscolex caudatus* were approximately 200 by 80  $\mu\text{m}$ , depending on the length of time after cell division. Both the long generation time and the large size can help to explain the disappearance of Ophryoscolecinae protozoa from all fermentors in our study. Solid retention time in our study was shorter than the generation time, and the pore size of nylon bags (100  $\mu\text{m}$ ) probably limited the entrance of Ophryoscolecinae

into the bags and their attachment to digesta. In agreement with this hypothesis, Meyer and Mackie (1986) reported that some of the large protozoa, such as *Polyplastron* spp. and *Ophryoscolex* spp., were unable to enter into bags less than 53 µm of pore size.

#### IV – Conclusions

The results indicate that under the conditions of the present study, it was not possible to maintain protozoa numbers similar to those in the rumen, but protozoa were present after 14 of incubation in all fermentors. Only Entodiniinae were able to grow in HC-fed fermentors by the end of the trial, but Entodiniinae, Isotrichidae and Diplodiniinae were maintained in fermentors receiving HF diets. In general, greater protozoa numbers were observed in the fermentors fed diets containing A compared with those fed G diets, and shifts in protozoa populations in response to changes in F:C ratio were similar to those observed *in vivo*.

#### References

- Abe, M. and 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.*, 36. p. 941-950.
- 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. p. 209-220.
- 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. p. 113-119.
- Crawford, Jr. R.J., Hoover, W.H. and Knowlton, P.H. 1980. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. I. Dry matter and fiber digestion, VFA production and protozoa numbers. *J. Anim. Sci.*, 51. p. 975-985.
- Czerkawski, J.W. and Breckenridge, G. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.*, 38. p. 371-384.
- Dehority, B. A. 1993. *Laboratory manual for classification and morphology of ruminal ciliate protozoa*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

- Dehority, B. A. 2004. *In vitro* determination of generation times for Entodinium exiguum, Ophryoscolex purkynjei and Eudiplodinium maggii. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 51. p. 333–338.
- Eadie, J.M. 1962. The development of rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management. *J. Gen. Microbiol.*, 29. p. 563-578.
- Franzolin, R., and Dehority, B. A. 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *J. Anim. Sci.*, 74. p. 2803-2809.
- Goad, D.W., Goad, C.L. and Nagaraja, T. G. 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J Anim. Sci.*, 76. p. 234-241.
- Hristov, A. N., Ivan, M. Rode, L. M., and McAllister, T. A. 2001. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets. *J. Anim. Sci.*, 79. p. 515-524.
- Jouany, J. P. 1989. Effects of diet on populations of rumen protozoa in relation to fibre digestion. In: Nolan, J.V., Leng, R.A., Demeyer, D.I. (Eds.). *The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion*. Penambul Books, Armidale, Australia.
- Meyer, J.H.F. and Mackie, R.I. 1986. Microbiological evaluation of the intraruminal in sacculus digestion technique. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51. p. 622-629.
- Moumen, A., Yáñez-Rúiz, D.R., Carro, M.D. and Molina-Alcaide, E. 2007. Protozoa evolution in single-flow continuous culture fermentors and Rusitec fermentors fed high-forage diets. *Options méditerranéennes*, Serie A (In press).
- Nakamura, F. and Kurihara, Y. 1978. Maintenance of a certain rumen protozoal population in a continuous *in vitro* fermentation system. *Appl. and Env. Microbiol.*, 35. p. 500-506.
- Slyter, L.L. and Putnam, P.A. 1967. *In vivo* vs. *in vitro* continuous culture of ruminal microbial populations. *J. Anim. Sci.*, 26. p. 1421-1427.
- Sylvester, J.T., Karnati, S.K.R. Dehority, B.A. Morrison, M., Smith, G.L., St-Pierre, N.R. and Firkins, J.L. 2009. Rumen ciliated protozoa decrease generation time and adjust 18S ribosomal DNA copies to adapt to decreased transfer interval, starvation, and monensin. *J. Dairy Sci.*, 92. p. 256–269.
- Williams, A.G. and Coleman, G.S. 1992. *The Rumen Protozoa*. Springer-Verlag, New York.

Williams, P.P., Davis, R.E., Doetsch, R.N. and Gutierrez, J. 1961. Physiological studies of the rumen protozoan *Ophryoscolex caudatus* Eberlein. *Appl. Microbiol.*, 9. p. 405-409.

### ***4.3. Prueba 3***

*Effects of dilution rate and retention time of concentrate on efficiency of microbial growth, methane production, and ruminal fermentation in Rusitec fermenters*





**Effects of dilution rate and retention time of concentrate on efficiency of microbial growth, methane production, and ruminal fermentation in Rusitec fermenters**

M. E. Martínez, M.J. Ranilla, S. Ramos, M. L. Tejido and  
M. D. Carro

Departamento de Producción animal, Universidad de León,  
24007 León, Spain

***Journal of Dairy Science* 92: 3930–3938**  
**doi:10.3168/jds.2008-1975**



**ABSTRACT.** The objective of this study was to investigate the effects of two dilution rate (DL) and two concentrate retention time (RT) on microbial growth, methane production and fermentation of a 30:70 alfalfa hay:concentrate diet in Rusitec fermenters maintained at similar pH. The DL were 3.78 (LDL) and 5.42%/h (HDL), and concentrate retention time was either 24 (T24) or 48 h (T48). Forage RT was 48 h in all fermenters. Apparent disappearance of diet DM and NDF was greater in HDL fermenters compared with LDL ones, but there was a significant DL x concentrate RT interaction showing that the effect of DL was more pronounced in T48 compared with T24 fermenters. Methane production was not affected by DL, but was greater in T48 compared with T24 fermenters which was consistent with the increased fiber degradation in T48 fermenters. Increasing DL augmented VFA production and molar proportions of propionate, isovalerate and valerate, and reduced those of caproate, but no effects were observed on acetate, butyrate and isobutyrate proportions. Increasing concentrate RT resulted in greater VFA production and proportions of acetate, butyrate and caproate, but reduced those of propionate, valerate and isovalerate. Ammonia-N production was not affected by concentrate RT, but was greater at HDL compared with LDL. Microbial growth was not affected by DL, but microbial growth efficiency was lower in HDL compared with LDL fermenters. Concentrate RT affected microbial growth and its efficiency, both being greater in T48 compared with T24 fermenters. Carboxymethylcellulase and xylanase activities in ruminal fluid were greater in HDL compared with LDL fermenters, but were not affected by concentrate RT. There were DL x concentrate RT interactions for diet apparent disappearance, molar proportions of propionate, butyrate, isovalerate and caproate, and acetate:propionate ratio, indicating that effects of DL on these variables were influenced by concentrate RT. The results would indicate that using higher DL and shorter concentrate RT than those typically used in Rusitec fermenters would contribute to improve the simulation of *in vivo* fermentation of high-concentrate diets.

**Key words:** dilution rate, retention time, Rusitec, microbial growth

## INTRODUCTION

Ruminal dilution rate (**DL**) and solids retention time (**RT**) have been identified as factors influencing ruminal fermentation and microbial growth, but results reported in

the literature are controversial. Whereas some studies have indicated greater VFA production and microbial growth with increasing DL (Stern and Hoover, 1979; Meng et al., 1999) and decreasing solids RT (Hoover et al., 1982; Shriver et al., 1986; Schadt et al., 1999), no effects on VFA production (Isaacson et al., 1975; Hoover et al., 1984; Eun et al., 2004) or microbial growth (Hoover et al., 1984) have been found in others. Both DL and solids RT can be highly variable *in vivo*, and are affected by a number of factors including environment, physiological condition of the animal, dietary characteristics, and intake levels, among others (Stern et al., 2006). Therefore, it is necessary to determine what effects changes in DL and RT, *per se*, have on ruminal fermentation and efficiency of microbial growth (**EMG**) so that these conditions can be manipulated to support optimal microbial protein synthesis. Because of the difficulties in evaluating the influence of these factors *in vivo*, most of available results are from *in vitro* studies conducted with ruminal fermenters. Experimental increases in DL are usually obtained by increasing the amount of artificial saliva entering the fermenters. This generally results in an increased buffering capacity of the system, and, consequently, greater pH. Therefore, effects of DL and pH on fermentation and microbial growth are often confounded, although Hoover et al. (1984) pointed out that at a constant solids RT, pH was more important than DL in controlling ruminal digestion. In addition, in the single-effluent continuous-culture fermenters used in some experiments (Meng et al., 1999), solid and liquid fractions flow simultaneously out of fermenters and increasing DL result in concomitant decreases of solids RT, thus being difficult to separate the relative effect of each factor. In contrast, dual-effluent continuous-culture fermenters allow a precise control of both DL and solids RT (Hoover et al., 1984; Schadt et al., 1999). In Rusitec fermenters feed is incubated in nylon bags that are taken out daily at a fixed time, thus allowing a precise control of solids RT.

Finally, all information that we are aware of has been obtained in cattle, and to our knowledge no studies investigating the effects of DL and solids RT in fermenters inoculated with ruminal fluid of sheep have been conducted to date. Because both DL and solids RT have been reported to be different in each species (Colucci et al., 1990), the aim of this work was to analyze the effect of DL and concentrate RT on ruminal fermentation and microbial growth in Rusitec fermenters inoculated with sheep ruminal fluid and maintained under similar pH conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### *Apparatus, Animals, and Diet*

One 16-d incubation trial was carried out using 16 Rusitec fermenters (Czerkawski and Breckenridge, 1977). Fermenters had an effective volume of 600 mL, and the general incubation procedure was as described by Giraldo et al. (2007). All fermenters received daily 30 g of DM of a 30:70 alfalfa hay:concentrate (DM basis) diet (Table 4.3.1.). Hay was chopped (approximately at 0.5-cm pieces), and the concentrate was ground through a 3-mm sieve. Forage and concentrate were fed into separate nylon bags (100- $\mu$ m pore; 8 x 15 cm), one containing 9 g of alfalfa hay and other 21 of concentrate (DM basis).

**Table 4.3.1.** Ingredients and chemical composition of experimental diets

Item	
Ingredient, % of DM	
Grass hay	30
Barley	15.2
Gluten feed	14.5
Wheat middlings	13.8
Soybean meal	9.7
Palmkern meal	9.0
Wheat	3.5
Corn	3.5
Vitamin-Mineral premix <sup>1</sup>	1.0
Chemical composition of the diet	
DM, %	92.5
OM, % of DM	90.9
N, % of DM	2.70
NDF, % of DM	35.9
ADF, % of DM	17.4
<sup>15</sup> N, % N	0.3674
ME, <sup>2</sup> Mcal/kg of DM	2.45

<sup>1</sup> Vitamin-mineral premix contained per kilogram of DM: 11,250 IU of vitamin A; 2,250 IU of vitamin D<sub>3</sub>; 25 mg of Vitamin E; and 10 mg of CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O.

<sup>2</sup> Estimated according to the NRC (1985).

The inoculum was obtained from 4 ruminally fistulated sheep fed the same diet administered to the fermenters for 21 d before starting the *in vitro* trial. Sheep were managed according to the protocols approved by the León University Institutional

Animal Care and Use Committee. On the first day of the experiment, each fermenter was inoculated with 250 mL of strained rumen fluid, 200 mL artificial saliva, and 80 g of solid rumen content supplied into a nylon bag. Ruminal contents from each sheep were collected immediately before the morning feeding, mixed, strained through two layers of cheesecloth, and transferred to the fermenters within 30 minutes after collection. Mean value of pH in ruminal fluid was  $6.47 \pm 0.173$ .

### ***Experimental Procedure and Sampling***

The experiment had a factorial design with two DL (low (**LDL**) and high (**HDL**)) and two concentrate RT times of 24 (**T24**) and 48 h (**T48**). Forage RT was 48 h in all fermenters. Treatments were assigned randomly so that four fermenters received each of the treatments. Flow through the fermenters was maintained by continuous infusion of artificial saliva (pH = 8.4; 9.8 g of NaHCO<sub>3</sub>, 3.72 g of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.47 g of NaCl, 0.57 g of KCl, 0.053 g of CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, and 0.128 g of MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O per L) at two different rates of 545 and 780 mL/d, approximating DL of 3.78 (LDL) and 5.42%/h (HDL), respectively. These DL and solids RT were chosen to resemble values previously observed *in vivo* in sheep (Ranilla et al., 1998; Carro et al., 2000; Valdés et al., 2000). The HDL fermenters received diluted saliva (70%) in order to infuse daily the same amount of salts in all fermenters and maintain similar pH. Changes in the saliva composition were based on previous results (Carro et al., 1995; Carro et al., 2009). On d 11, a dose of 3.5 mg of <sup>15</sup>N (98% enriched <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl; Tracer SA, Madrid, Spain) was added into each fermenter to instantaneously label the ammonia-N pool. From d 11 to 15, a solution of <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl was added to the artificial saliva at a rate of 4.0 mg of <sup>15</sup>N per g of dietary N. Each fermenter was flushed daily with 2 L of CO<sub>2</sub> both before and after feeding, in order to remove gases produced during the fermentation and the air introduced in the fermenter during feeding, respectively.

On d 11, 12, 13 and 14, pH of each fermenter's fluid was determined immediately before feeding and the following samples were collected. The gas produced was collected daily in hermetic bags to determine the gas production and the concentrations of CH<sub>4</sub>. Liquid effluent was collected daily in flasks containing a solution of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20%; v:v) to maintain pH below 2. One mL of effluent was added to 1 mL of deproteinizing solution (10% of metaphosphoric acid and 0.06% crotonic acid; wt/vol)

for VFA determination, and 5 mL of effluent were stored at -20°C for ammonia-N and total lactate determinations. Two nylon bags (one with forage and one with concentrate) from each fermenter were collected daily, washed twice with 40 mL of fermenter liquid and then washed in the cold rinse cycle (20 min) of a washing machine. The DM apparent disappearance was calculated from loss in weight after oven drying at 60°C for 48 h, and the residues were analyzed for NDF and acid-detergent fiber (**ADF**) to estimate NDF and ADF disappearance. On d 12, about 4 mL of fermenter fluid were taken at 3, 6 and 9 h after feeding, and pH was immediately measured. In addition, 4 mL of fluid were taken before feeding on d 14, and immediately frozen at -80°C for determination of carboxymethylcellulase, xylanase and amylase activities.

On days 15 and 16 a water solution saturated with HgCl<sub>2</sub> (5 mL) was added (replacing the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution which could cause bacterial lysis) to the overflow containers, which were held in an icewater bath to impede microbial growth. Approximately 500 mL of effluent was used for isolation of liquid-associated microbial pellets (**LAM**) by differential centrifugation (Ranilla and Carro, 2003). The contents of nylon bags removed on d 15 and 16 were used to determine the growth of solid-associated microorganisms (**SAM**). About 20% of solid content from each nylon bag was frozen and lyophilized for determination of DM, NAN and <sup>15</sup>N enrichment. The SAM pellets were isolated after treating the remaining solid content with a saline solution (0.85% NaCl) of 0.1% methylcellulose at 38°C for 15 min with continuous shaking. The residue was then filtered through two layers of nylon cloth (40-µm pore size), resuspended in cold (4°C) saline solution of 0.1% methylcellulose, and chilled at 4°C for 24 h. The filtrate obtained each day was mixed and used to isolate SAM by differential centrifugation as described by Ranilla and Carro (2003). Substrate was also analyzed for its natural <sup>15</sup>N content, and this value was used for background correction before <sup>15</sup>N infusion.

### ***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 and ADF analyses were carried out according to Van Soest et al. (1991) using an ANKOM<sup>220</sup> Fibre Analyzer unit (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA). Sodium sulphite and heat-stable amylase were used in analysis of NDF and

ADF, and they were expressed inclusive of residual ash. The volume of gas produced was measured with a drum-type gas meter (model TG1; Ritter Apparatebau GmbH, Germany) and the concentration of methane was analyzed by GLC as described by Carro and Miller (1999). Preparation of samples for  $^{15}\text{N}$  analysis followed the procedures described by Carro and Miller (1999) and analyses of  $^{15}\text{N}$  enrichment were performed by GC-MS (VG PRISM II, Middlewich, UK) connected in series to a DUMAS-style N analyzer (Model 1108, Carlo Erba Instruments, Milan, Italy).

For determination of enzymatic activities in ruminal fluid samples, samples were defrosted, and cells were lysed using a Mini-Beadbeater (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) to release intracellular enzymes. The treatment consisted of three 60-s pulses at 4°C using 0.1 mm glass beads. Unbroken cell material was removed by centrifugation (10.000 x g, 10 min, 4°C), and the supernatant (200  $\mu\text{L}$ ) was used for analyses. Carboxymethylcellulase, xylanase and amylase activities were determined following the procedures of Colombatto and Beauchemin (2003) with the modifications described by Giraldo et al. (2008) using as substrates carboxymethylcellulose, oat spelt xylan and soluble starch, respectively. Enzymatic activities were expressed as nmol of glucose or xylose released from the corresponding substrates by 1 mL of ruminal fluid in 1 min at 39°C and pH = 6.5.

### ***Calculations and Statistical Analyses***

The amount of OM apparently fermented was estimated from VFA production using the equation proposed by Blanchart et al. (1989). The proportion of digesta NAN (liquid or solid) of microbial origin was estimated for each fermenter by dividing the  $^{15}\text{N}$  enrichment (atoms % in excess) of the NAN portion of digesta by the enrichment of the corresponding microbial pellets (LAM or SAM). Daily microbial N production (mg/d; LAM or SAM) was estimated by multiplying total NAN production in the corresponding digesta (liquid or solid) by the proportion attributed to the microbes. Total daily microbial production was calculated as the sum of the flows of LAM and SAM. The EMG was expressed as mg microbial N per g OM apparently fermented.

The volume of gas produced in fermenters (L/d) was corrected for temperature (0°C) and pressure ( $1.013 \times 10^5$  Pa) conditions, and the amount of methane produced (mmol) was calculated by multiplying the gas produced by the methane concentration in



the analyzed sample. Fermentation data were analyzed as a 2 x 2 factorial arrangement of treatments and four replicates using the MIXED procedure (SAS Inst. Inc., Cary, NC). The effects of treatments and their interaction were considered fixed, and the effect of sampling day was evaluated as a repeated measure. In the analysis of results of microbial growth and enzyme activities in the fermenters, day of sampling was excluded from the model. When a significant effect of treatment ( $P \leq 0.05$ ) was detected, differences among means were tested using the Tukey's multiple comparison test.

## RESULTS AND DISCUSSION

The experimental approach used in the present study differed from others carried out previously to analyze the effects of DL and solids RT on microbial growth and ruminal fermentation. Because one main objective was to investigate the effect of DL and RT, we tried to isolate these factors and to maintain similar pH in all fermenters. In addition, solids RT is not affected by DL in Rusitec fermenters, and effects of both factors can be analyzed independently. To the best of our knowledge this is the first study in which a different RT was selected for forage and concentrate in Rusitec fermenters, as usually the diet is incubated for 48 h. This would more closely reflect the *in vivo* situation, because concentrate feeds have been shown to have shorter RT in the rumen compared with forages (Mambrini and Peyraud, 1997).

As expected, an increase ( $P < 0.001$ ) in the amount of effluent was observed when DL augmented (Table 4.3.2.), whereas pH before feeding and mean pH over 9 h after feeding were not affected ( $P = 0.47$  and  $0.67$ , respectively) by DL. There was no concentrate RT x DL interaction for these variables ( $P = 0.67$  and  $0.95$ , respectively). Apparent disappearance of diet DM, NDF and ADF was greater ( $P < 0.001$ ) in HDL compared with LDL fermenters, which agrees with previous studies (Crawford et al., 1980; Eun et al., 2004; Fondevila and Pérez-Espés, 2008) but it is in contrast with others in which no effect of DL was observed (Czerkawski and Breckenridge, 1977; Carro et al., 1995). Meng et al. (1999) observed that increasing DL resulted in a decrease in DM digestibility for three different diets, which was attributed to a concomitant decrease in solids RT as the single-effluent continuous-culture system used

**Table 4.3.2.** Effect of the retention time and dilution rate on the amount of effluent, pH and diet apparent disappearance in Rusitec fermenters<sup>1</sup>

Retention time (h)	Dilution rate				SEM <sup>2</sup>	Statistical significance of the effects (P value)		
	High		Low			Retention time (RT)	Dilution rate (DL)	RT x DL
	24	48	24	48				
Effluent, mL/d	777 <sup>b</sup>	784 <sup>b</sup>	538 <sup>a</sup>	552 <sup>a</sup>	17.6	0.25	< 0.001	0.67
pH before feeding	6.54	6.54	6.55	6.56	0.037	0.87	0.47	0.95
pH (0 - 9 h) <sup>3</sup>	6.43	6.41	6.42	6.43	0.033	0.62	0.67	0.31
Apparent disappearance of:								
Total diet DM, %	69.8 <sup>b</sup>	74.3 <sup>c</sup>	68.5 <sup>a</sup>	70.9 <sup>b</sup>	0.75	< 0.001	< 0.001	0.008
Forage DM, %	75.9 <sup>c</sup>	73.7 <sup>b</sup>	73.1 <sup>b</sup>	70.3 <sup>a</sup>	1.39	0.001	< 0.001	0.69
Concentrate DM, %	67.2 <sup>a</sup>	74.5 <sup>c</sup>	66.5 <sup>a</sup>	71.2 <sup>b</sup>	1.01	< 0.001	< 0.001	0.01
Total diet NDF, %	38.6 <sup>b</sup>	44.5 <sup>c</sup>	36.2 <sup>a</sup>	38.5 <sup>b</sup>	1.34	< 0.001	< 0.001	0.01
Forage NDF, %	53.2 <sup>c</sup>	49.0 <sup>b</sup>	49.0 <sup>b</sup>	43.9 <sup>a</sup>	2.38	< 0.001	< 0.001	0.72
Concentrate NDF, %	30.5 <sup>a</sup>	42.1 <sup>c</sup>	29.3 <sup>a</sup>	35.7 <sup>b</sup>	1.70	< 0.001	< 0.001	0.003
Total diet ADF, %	31.6 <sup>b</sup>	35.3 <sup>c</sup>	28.6 <sup>a</sup>	29.3 <sup>ab</sup>	1.60	0.008	< 0.001	0.07
Forage ADF, %	41.6 <sup>c</sup>	37.3 <sup>b</sup>	39.4 <sup>bc</sup>	31.3 <sup>a</sup>	3.45	0.001	0.021	0.28
Concentrate ADF, %	24.0 <sup>a</sup>	33.8 <sup>c</sup>	23.0 <sup>a</sup>	28.0 <sup>b</sup>	2.12	< 0.001	0.002	0.03

<sup>a, b, c</sup> Within a row, means without a common superscript letter differ,  $P \leq 0.05$  (Tukey's test).

<sup>1</sup> Values are the mean of 4 daily observations in each of 4 fermenters (n = 16). Diet was composed of 30% alfalfa hay and 70% concentrate (DM basis).

<sup>2</sup> SEM = standard error of the mean.

<sup>3</sup> Values were determined at 0, 3, 6 and 9 h after feeding.

in their study allowed solid and liquid fractions to flow simultaneously out of fermenters. Probable reasons for the discrepancy among studies include differences in the diets incubated, type of fermenters, and inoculums characteristics. The basal diet in our study was chosen to be representative of those used in sheep in field conditions in Spain, but its composition was different from dairy cow diets used in other studies. In Rusitec fermenters solid RT is not affected by DL, because the diet is incubated into nylon bags which are taken out at a fixed time. Moreover, it has to be taken into account that most of previous studies have been conducted using ruminal inoculum from cattle, whereas inoculum from sheep was used in the present study. In our study there were concentrate RT x DL interactions for apparent disappearance of concentrate DM, NDF and ADF ( $P = 0.01$ ,  $0.003$  and  $0.03$ , respectively), indicating that the effects of DL on diet disappearance were more pronounced in T48 compared with T24 fermenters (Table 4.3.2.).

Contrary to our expectations, apparent disappearance of forage DM, NDF and ADF was affected by concentrate RT, being greater in T24 compared with T48 fermenters ( $P = 0.001$ ,  $< 0.001$  and  $0.001$ , respectively). Because forage RT was 48 h in all fermenters, the observed effect cannot be attributed to this factor. As expected, apparent disappearance of concentrate increased ( $P < 0.001$ ) as concentrate RT increased from 24 to 48 h, which is in accordance with previous studies (Crawford et al., 1980; Shriver et al., 1986; Schadt et al., 1999).

Only a few studies have investigated the effects of DL and solids RT on methane production by ruminal microorganisms. In the present study, methane production was not affected ( $P = 0.69$ ) by DL (Table 4.3.3.). In contrast, Eun et al. (2004) observed an increase ( $P = 0.01$ ) in methane production as DL augmented, and Isaacson et al. (1975) reported a decrease in methane formation when DL increased. Methane production is strongly affected by ruminal pH, and Russell (1998) showed that methane production *in vitro* decreased dramatically at pH below 6.3. However, in our study pH was not affected by DL, and this factor can be ruled out (Table 4.3.2.). In contrast, in the study of Eun et al. (2004) pH increased from 5.0 to 6.3 as DL increased from 3.2 to 12.5%/h, and the greater pH could have contributed to the increased methane production observed at the highest DL. The growth rate of methanogens is relatively slow, which could result in reduced methanogenic archaea numbers at high DL (Eun et al., 2004), but the highest

**Table 4.3.3.** Effect of the retention time and dilution rate on daily production of methane and VFA in Rusitec fermenters<sup>1</sup>

Retention time (h)	Dilution rate				SEM <sup>2</sup>	Statistical significance of the effects (P value)		
	High		Low			Retention time (RT)	Dilution rate (DL)	RT x DL
	24	48	24	48				
Methane, mmol/d	19.2 <sup>a</sup>	22.5 <sup>b</sup>	19.6 <sup>a</sup>	21.6 <sup>b</sup>	0.18	< 0.001	0.69	0.32
Total VFA production, mmol/d	93.7 <sup>bc</sup>	97.7 <sup>c</sup>	85.7 <sup>a</sup>	91.0 <sup>b</sup>	3.22	0.006	< 0.001	0.67
Individual, mol/100 mol								
Acetate	44.1 <sup>a</sup>	45.4 <sup>b</sup>	44.2 <sup>a</sup>	45.7 <sup>b</sup>	0.71	< 0.001	0.62	0.73
Propionate	19.8 <sup>d</sup>	16.0 <sup>b</sup>	17.7	12.9 <sup>a</sup>	0.55	< 0.001	< 0.001	0.049
Butyrate	21.7 <sup>b</sup>	19.6 <sup>a</sup>	20.7 <sup>b</sup>	21.2 <sup>bc</sup>	0.510	0.006	0.28	< 0.001
Isobutyrate	0.95	1.02	1.08	1.08	0.127	0.56	0.14	0.63
Valerate	5.63 <sup>d</sup>	4.73 <sup>c</sup>	4.13 <sup>b</sup>	3.74 <sup>a</sup>	0.141	< 0.001	< 0.001	0.004
Isovalerate	3.65 <sup>b</sup>	3.43 <sup>c</sup>	2.98 <sup>b</sup>	2.68 <sup>a</sup>	0.173	0.007	< 0.001	0.69
Caproate	4.23 <sup>a</sup>	9.84 <sup>b</sup>	9.22 <sup>b</sup>	12.7 <sup>c</sup>	0.510	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Acetate:propionate	2.24 <sup>a</sup>	2.85 <sup>c</sup>	2.53 <sup>b</sup>	3.55 <sup>d</sup>	0.107	< 0.001	< 0.001	< 0.001
OM apparently fermented, g/d <sup>3</sup>	8.05	7.86 <sup>b</sup>	6.87 <sup>a</sup>	6.99 <sup>a</sup>	0.265	0.78	< 0.001	0.26
Methane (mol):VFA (mol)	0.205 <sup>a</sup>	0.230 <sup>b</sup>	0.229 <sup>b</sup>	0.237 <sup>b</sup>	0.0101	0.009	0.03	0.31
H recovery, %	88.8	91.6	91.8	89.2	2.62	0.93	0.83	0.047

<sup>a, b, c, d</sup> Within a row, means without a common superscript letter differ,  $P \leq 0.05$  (Tukey's test).

<sup>1</sup> Values are the mean of 4 daily observations in each of 4 fermenters (n = 16). Diet was composed of 30% alfalfa hay and 70% concentrate (DM basis).

<sup>2</sup> SEM = standard error of the mean.

<sup>3</sup> OM apparently fermented was estimated from net production of acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, isovalerate, and valerate (Blanchart et al., 1989)

dilution rate in our study (5.4%/h) did not have a negative impact on methane production. Methane production was greater ( $P = 0.006$ ) in T48 compared with T24 fermenters, which is in accordance to the greater ( $P < 0.001$ ) acetate and lower ( $P < 0.001$ ) propionate proportions observed in T48 fermenters (Table 4.3.3.). Similar effects of solids RT have been reported previously (Crawford et al., 1980; Schadt et al., 1999), and would reflect the reduced proportions of fiber digested as solids RT decrease.

Changes in DL have been reported to affect VFA production and profile, but the effect has been variable. In agreement with others (Stern and Hoover, 1979; Crawford et al., 1980), HDL increased ( $P < 0.001$ ) total VFA production compared with LDL. These results contrast to those from other studies in which increasing DL has been found to decrease (Carro et al., 1995; Meng et al., 1999) or not to affect VFA production (Isaacson et al., 1975; Hoover et al., 1984; Eun et al., 2004). Increasing DL increased ( $P < 0.001$ ) molar proportions of propionate without affecting acetate proportions, as it has been documented in other studies (Carro et al., 1995; Isaacson et al., 1975). In contrast, molar proportions of propionate have been reported to be lower (Crawford et al., 1980) or not affected (Eun et al., 2004; Fondevila and Pérez-Espés, 2008) as a result of increased DL. No changes ( $P = 0.28$ ) in butyrate proportions were observed in the present study, but others (Carro et al., 1995; Meng et al., 1999; Eun et al., 2004) have found a decrease in butyrate proportions as DL increased. These controversial results could be due to a number of factors, among them the type of diet (Meng et al., 1999).

In agreement with our results, Eun et al. (2004) observed greater proportions of isovalerate and valerate as DL increased, which might indicate enhanced proteolytic activity. This is further suggested by the greater ( $P < 0.001$ ) ammonia-N production and the lower ( $P < 0.001$ ) ammonia- $^{15}\text{N}$  enrichment observed in HDL compared with LDL fermenters (Table 4.3.4.). The greater ammonia-N production in HDL fermenters could have been due to either enhanced rate of production or reduced utilization by ruminal microbes. The lower ammonia- $^{15}\text{N}$  enrichment observed in HDL fermenters would indicate a greater ammonia-N production, because a similar amount of  $^{15}\text{N}$  was infused in each fermenter.

**Table 4.3.4.** Effect of the retention time and dilution rate on daily production of ammonia-N and NAN, daily N flow of liquid-associated (LAM) and solid-associated microorganisms (SAM), and efficiency of microbial growth (EMG) in Rusitec fermenters<sup>1</sup>

Retention time (h)	Dilution rate				SEM <sup>2</sup>	Statistical significance of the effects (P value)		
	High		Low			Retention time (RT)	Dilution rate (DL)	RT x DL
	24	48	24	48				
Ammonia-N, mg/d	228 <sup>b</sup>	235 <sup>b</sup>	176 <sup>a</sup>	185 <sup>a</sup>	10.3	0.15	< 0.001	0.86
Dietary NAN flow, mg/d	210 <sup>ab</sup>	173 <sup>a</sup>	247 <sup>b</sup>	223 <sup>b</sup>	14.7	0.06	0.01	0.69
Microbial N flow, mg/d								
Total microorganisms	258 <sup>a</sup>	301 <sup>b</sup>	282 <sup>ab</sup>	305 <sup>b</sup>	11.5	0.02	0.26	0.41
LAM	142	172	146	153	10.1	0.09	0.47	0.28
SAM	117 <sup>a</sup>	129 <sup>b</sup>	136 <sup>b</sup>	152 <sup>c</sup>	3.6	0.003	< 0.001	0.64
SAM, % of total	45.3 <sup>a</sup>	43.1 <sup>a</sup>	48.8 <sup>b</sup>	50.0 <sup>b</sup>	1.65	0.72	0.01	0.35
EMG, mg microbial N/g OM fermented	32.2 <sup>a</sup>	38.4 <sup>b</sup>	41.0 <sup>bc</sup>	43.7 <sup>c</sup>	1.69	0.02	0.002	0.33
N content of LAM, mg/g DM	75.6 <sup>b</sup>	74.3 <sup>b</sup>	63.1 <sup>a</sup>	69.6 <sup>ab</sup>	3.22	0.44	0.02	0.25
N content of SAM, mg/g DM	53.4 <sup>a</sup>	58.9 <sup>b</sup>	59.5 <sup>b</sup>	60.3 <sup>b</sup>	1.80	0.11	0.06	0.22
<sup>15</sup> N enrichment, atoms % excess								
LAM	0.2949	0.2872	0.2941	0.2558	0.01466	0.29	0.15	0.32
SAM	0.1437	0.1303	0.1378	0.1413	0.00403	0.54	0.25	0.06
Ammonia-N	0.7956 <sup>bc</sup>	0.6575 <sup>a</sup>	0.8112 <sup>c</sup>	0.7466 <sup>b</sup>	0.01783	0.01	< 0.001	0.06
Proportion of microbial N derived from ammonia-N, %								
LAM	37.2 <sup>ab</sup>	43.7 <sup>b</sup>	36.4 <sup>a</sup>	34.0 <sup>a</sup>	2.09	0.03	0.34	0.06
SAM	18.1	19.9	17.0	18.9	0.87	0.25	0.06	0.94

<sup>a, b, c</sup> Within a row, means without a common superscript letter differ,  $P \leq 0.05$  (Tukey's test).

<sup>1</sup> Values are the mean of 1 daily observation in each of 4 fermenters (n = 4). Diet was composed of 30% alfalfa hay and 70% concentrate (DM basis).

<sup>2</sup> SEM = standard error of the mean.

The production of VFA was greater ( $P = 0.006$ ) in T48 compared with T24 fermenters, which is consistent with the greater diet apparent disappearance observed in T48 fermenters. Increasing concentrate RT resulted in increased ( $P < 0.001$ ) acetate and decreased propionate ( $P < 0.001$ ), isovalerate ( $P < 0.001$ ) and valerate ( $P = 0.007$ ) proportions. Readily fermented carbohydrates were probably fermented in the first hours of incubation, and only structural carbohydrates were available to ruminal microbes after 24 h of incubation, which would explain the increased acetate and decreased propionate proportions in T48 compared with T24 fermenters. The molar proportions of caproate and acetate:propionate ratio were lower ( $P < 0.001$ ) in T24 compared with T48 fermenters, and in HDL compared with LDL fermenters. These results seem to indicate that the unphysiologically high caproate concentrations and acetate:propionate ratios found in previous experiments with Rusitec fermenters with high-concentrate diets (Gomez et al., 2005; Carro et al., 2009) might have been due to the high RT of concentrate feeds (48 h in all the cited experiments) and to the low DL (about 3.8%/h). Using higher DL and shorter RT of concentrate in Rusitec fermenters could probably contribute to improve the simulation of the *in vivo* fermentation when high-concentrate diets are used, as it has been previously suggested (Carro et al., 2009). Hydrogen recoveries were in the range of those observed in previous experiments with Rusitec fermenters (Gómez et al., 2005; Giraldo et al., 2007), and were not affected either by concentrate RT ( $P = 0.93$ ) or DL ( $P = 0.83$ ).

Alterations in the microbial communities may have been indicated by changes in the N content of microbes (Table 4.3.4.). Increasing DL increased ( $P = 0.02$ ) N content of LAM, but tended to decrease ( $P = 0.06$ ) N content of SAM. In contrast, there were no effects ( $P > 0.05$ ) of concentrate RT on microbes N content, and no RT x DL interaction was detected ( $P > 0.05$ ). The proportions of microbial N derived from ammonia-N were in the range of values found in other experiments conducted with Rusitec fermenters in our laboratory (unpublished results). The uptake of ammonia-N by SAM tended to be greater ( $P = 0.06$ ) in HDL compared with LDL fermenters, which might indicate that microbial communities developed in the fermenters were affected by DL. This is further suggested by the fact that dietary NAN flow was greater ( $P = 0.01$ ) in LDL compared with HDL fermenters, which indicates population shifts to microbes with less proteolytic activity and agrees with the lower ammonia-N production. Schadt et al. (1999) observed that increasing solids RT in continuous cultures of ruminal

microorganisms increased digestion of fiber and DM, but protein digestion was not greatly affected. This is in agreement with our results, because ammonia-N production was not affected ( $P = 0.15$ ) by concentrate RT, and flow of dietary N only tended ( $P = 0.06$ ) to be greater in T24 compared with T48 fermenters.

Xylanase activity of ruminal fluid was greater ( $P = 0.04$ ) and carboxymethylcellulase activity tended to be greater ( $P = 0.06$ ) in HDL compared with LDL fermenters, but there were no differences ( $P = 0.27$ ) in amylase activity (Table 4.3.5.). Because the daily flow of LAM was not affected by DL ( $P = 0.47$ ; mean values of 157 and 150 mg/d for HDL and LDL, respectively), differences in LAM concentrations between HDL and LDL were not expected, and the results would indicate that HDL promoted the development of microbial populations with greater fibrolytic activity, especially in T48 fermenters. This is further supported by the greater substrate NDF and ADF disappearance observed in HDL-T48 fermenters (Table 4.3.2.). In contrast, enzymatic activities of ruminal fluid were not affected ( $P = 0.10$  to  $0.75$ ) by concentrate RT, and no interaction RT x DL was detected ( $P = 0.11$  to  $0.43$ ) for any of these variables.

**Table 4.3.5.** Effect of the retention time and dilution rate on carboxymethylcellulase, xylanase and amylase activities in ruminal fluid in Rusitec fermenters<sup>1</sup>

	Dilution rate				SEM <sup>2</sup>	Statistical significance of the effects (P value)		
	High		Low			Retention time (RT)	Dilution rate (DL)	RT x DL
Retention time (h)	24	48	24	48				
Carboxymethylcellulase	99.3	97.9	92.1	94.9	2.45	0.75	0.06	0.41
Xylanase	1010 <sup>a</sup>	1139 <sup>b</sup>	990 <sup>a</sup>	991 <sup>a</sup>	36.5	0.10	0.04	0.11
Amylase	385	365	391	399	16.7	0.73	0.27	0.43

<sup>a, b</sup> Within a row, means without a common superscript letter differ,  $P \leq 0.05$  (Tukey's test).

<sup>1</sup> Values are the mean of 1 daily observation in each of 4 fermenters ( $n = 4$ ). Diet was composed of 30% alfalfa hay and 70% concentrate (DM basis). Carboxymethylcellulase and amylase activities are expressed as nmol of glucose released from carboxymethylcellulose and soluble starch, respectively, by 1 mL of ruminal fluid in 1 min at 39°C and pH = 6.5. Xylanase activity is expressed as nmol of xylose liberated from oat spelt xylan by 1 mL of ruminal fluid in 1 min at 39°C and pH = 6.5.

<sup>2</sup> SEM = standard error of the mean.



In general, *in vitro* studies with pure or mixed cultures of rumen bacteria have indicated a greater microbial growth and EMG with increasing DL (Isaacson et al., 1975; Stern and Hoover, 1979; Meng et al., 1999) and decreasing solids RT (Schadt et al., 1999) or both (Crawford et al., 1980; Shriver et al., 1986). In our study, DL did not affect total microbial N flow ( $P = 0.26$ ). In contrast, Eun et al. (2004) reported that microbial growth was increased ( $P = 0.01$ ) by increasing DL from 3.2 to 12.5 % / h in fermenters fed a high-concentrate diet, and Meng et al. (1999) observed that increasing DL from 2.5 to 20.0% / h increased linearly ( $P = 0.01$ ) the microbial N flow in fermenters fed three different diets. Because in these studies the pH increased with increasing DL, but it was not affected by DL in our work, results are not directly comparable. In addition, the DL in the present study were lower than those used in other studies with continuous-flow fermenters.

In Rusitec fermenters the solid phase is removed when the nylon bags containing the substrate are taken out daily. The proportion of microbial N in the substrate taken out of the fermenters was greater ( $P = 0.04$ ) in HDL compared with LDL fermenters (47.5 and 42.9%, respectively; results not shown), which would indicate that HDL promoted a greater colonization of feed particles. Although the proportion of microbial N in substrate residues was greater for HDL fermenters, the daily flow of SAM-N was lower ( $P < 0.001$ ) compared with that in LDL fermenters (Table 4.3.4.). This was due to the lower amount of substrate residues (forage and concentrate) recovered every day from HDL fermenters, as a consequence of increased substrate degradation (Table 4.3.2.). The SAM represented a lower ( $P = 0.01$ ) proportion of total microbial N flow for HDL compared with LDL fermenters (mean values for both concentrate RT of 44.2 and 49.4%, respectively), but the observed values were in the range of those found in fermenters (Ranilla and Carro, 2003) and cattle (Vlaeminck et al., 2006) fed high-concentrate diets.

Although higher DL are usually associated with shorter RT in the rumen (Stern et al., 2006), in Rusitec fermenters solids RT is not affected by DL. In our study, total microbial N flow was 1.12 times greater ( $P = 0.02$ ) in T48 compared with T24 fermenters. This was due to the greater ( $P = 0.003$ ) SAM flow observed in T48 fermenters, because differences in LAM flow did not reach the significance level ( $P = 0.09$ ). The proportion of microbial N in the substrate after incubation into the fermenters

was greater ( $P = 0.002$ ) for T48 compared with T24 fermenters (49.5 and 40.9%, respectively; results not shown), which could have been due to the fact that microbes had a longer time for colonization of concentrate particles. Although the amount of concentrate residues was lower in T48 fermenters due to the increased disappearance, the SAM flow was greater as a consequence of the increased amount of microbes attached to feed particles.

The values of EMG were in the range of those found in previous studies with fermenters fed high-concentrate diets (Meng et al., 1999; Carro et al., 2009). The EMG was decreased by increasing DL ( $P = 0.002$ ) and decreasing concentrate RT ( $P = 0.02$ ), but no DL x RT interaction ( $P = 0.33$ ) was detected. In agreement with our results, Hoover et al. (1984) reported that at pH 6.5 EMG decreased as DL increased from 4 to 8%/h, although in their study EMG increased as DL increased from 8 to 16%/h. Our results, however, contrast with the lack of effect on EMG as solids RT increased from 28 to 40 h in fermenters maintained at nearly constant pH (6.56 and 6.44, respectively) reported by Hoover et al. (1982), and the decreased EMG observed by Schadt et al. (1999) as solids RT increased from 10 to 30 h and pH changed from 6.10 to 6.75. It is possible that the different conditions in the two different types of fermenters (dual-flow continuous-culture fermenters in the studies of Hoover et al. (1982) and Schadt et al. (1999)) had contributed to the observed differences.

## CONCLUSIONS

Increasing DL in Rusitec fermenters maintained at similar pH increased DM, fiber and protein disappearance, VFA and ammonia-N production, and carboxymethylcellulase and xylanase activities of ruminal fluid, but did not affect methane production or microbial growth. Results suggest that increasing DL resulted in changes in microbial populations towards microbes with greater fibrolytic and proteolytic activities. Reducing concentrate RT from 48 to 24 h decreased diet disappearance, production of VFA and methane, and microbial flow and its efficiency, but did not affect ammonia-N production or protein disappearance, which would suggest that proteolytic microbes were not affected by concentrate RT. There were significant RT x DL interactions for several measured variables, indicating that the effects of DL on ruminal fermentation in Rusitec fermenters can be influenced by

concentrate RT. Finally, increasing DL and decreasing concentrate RT resulted in reduced molar proportions of caproate and acetate:propionate ratios, showing values in the range of those found *in vivo*. This would indicate that using higher DL and shorter concentrate RT than those typically used in Rusitec fermenters would contribute to improve the simulation of *in vivo* fermentation of high-concentrate diets.

## REFERENCES

- Association of Official Analytical Chemists. AOAC, 1999. Official Methods of Analysis, 16th Edition, 5<sup>th</sup> revision. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Blanchart, G., M. Durant, J. L. Barry, M. Bouiller-Oudot, and J. P. Jouany. 1989. Intérêts et limites des fermenteurs à flux semi-continu de type Rusitec dans l'étude des fermentations du rumen (Advantages and limits of the semi-continuous artificial rumen (Rusitec) for the study of rumen fermentation). *Ann. Zootech.* 38:285-314.
- Carro, M. D., P. Lebzién, and K. Rohr. 1995. Effects of pore size of nylon bags and dilution rate parameters in a semi-continuous artificial rumen. *Small Rumin. Res.* 15:113-119.
- Carro, M. D., and E. L. Miller. 1999. Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semicontinuous culture system (RUSITEC). *Br. J. Nutr.* 82:149-157.
- Carro, M. D., C. Valdés, M. J. Ranilla, and J. S. González. 2000. Effect of forage to concentrate ratio in the diet on ruminal fermentation and digesta flow kinetics in sheep. *Anim. Sci.* 70:127-134.
- Carro, M. D., M. J. Ranilla, A. I. Martín-García, and E. Molina-Alcaide. 2009. Comparison of microbial fermentation of high- and low-forage diets in Rusitec, single-flow continuous-culture fermenters and sheep rumen. *Animal*. doi:10.1017/S1751731108003844.
- Colombatto, D., and K. A. Beauchemin. 2003. A proposed methodology to standardize the determination of enzymatic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. *Can J. Anim. Sci.* 83:559-568.
- Colucci, P. E., G. K. MacLeod, W. L. Growum, I. McYillan, and D. J. Barney. 1990. Digesta kinetics in sheep and cattle fed diets with different forage to concentrate ratios at high and low intakes. *J. Dairy Sci.* 73:2143-2156.

- Crawford, R. J. Jr., W. H. Hoover, and P. H. Knowlton. 1980. 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.* 51:975-985.
- Czerkawski, J. W., and G. Breckenridge. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 38:371-384.
- Eun, J. S., V. Fellner, and M. L. Gumpertz. 2004. Methane production by mixed ruminal cultures incubated in dual-flow fermenters *J. Dairy Sci.* 87:112–121.
- Fondevila, M., and B. Pérez-Espés. 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.* 144:196–211.
- Giraldo, L.A., M. J. Ranilla, M. J. Tejido, and M. D. Carro. 2007. Influence of exogenous fibrolytic enzyme and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters. *Br. J. Nutr.* 98:753-761.
- Giraldo, L.A., M. J. Ranilla, M. J. Tejido, and M. D. Carro. 2008. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay based diet. *J. Anim. Sci.* 86:1617-1623.
- Gómez J. A., M. L. Tejido, and M. D. Carro. 2005. Mixed rumen micro-organisms growth and rumen fermentation of two diets in RUSITEC fermenters: influence of disodium malate supplementation. *Br. J. Nutr.* 93:479-484.
- Hoover, W. H., R. J. Jr. Crawford, and M. D. Stern. 1982. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. III. Solids retention time. *J. Anim. Sci.* 54:849-854.
- Hoover, W. H., C. R. Kincaid, G. A. Varga, W. V. Thayne, and L. L. Junkins, Jr. 1984. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. IV. pH and dilution rate. *J. Anim. Sci.* 58:692-699.
- Isaacson, H. R., F. C. Hinds, M. P. Bryant, and F. N. Owens. 1975. Efficiency of energy utilization by mixed rumen bacteria in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 58:1645-1659.
- Meng, Q., M. S. Kerley, P. A. Ludden and R. L. Belyea. 1999. Fermentation substrate and DR interact to affect microbial growth and efficiency. *J. Anim. Sci.* 77:206-214.
- Mambrini, M., and J. L. Peyraud. 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.* 37:427-442.

- NRC. 1985. Nutrient Requirement of Sheep. 6th ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Ranilla, M. J., and M. D. Carro. 2003. Diet and procedures used to detach particulate-associated microbes from ruminal digesta influence chemical composition of microbes and estimation of microbial growth in Rusitec fermenters. *J. Anim. Sci.* 81:537-544.
- Ranilla, M. J., S. López, F. J. Giráldez, C. Valdés and M. D. Carro. 1998. Comparative digestibility and digesta flow kinetics in two breeds of sheep. *Anim. Sci.* 66:389-396.
- Russell, J. B. 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 81:3222-3230.
- Shriver, B. J., W. H. Hoover, J. P. Sargent, R. J. Crawford, Jr., and W. V. Thayne. 1986. Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. *J. Dairy Sci.* 69:413-419.
- Stern, M. D., and W. H. Hoover. 1979. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: a review. *J Anim. Sci.* 49:1590-1603.
- Stern , M.D., A. Bach, and S. Calsamiglia. 2006. New concepts in protein nutrition of ruminants. Pages 45-66 in Proc. 21st Annual Southwest Nutrition and Management Conf., Tempe, AZ.
- Schadt, I., W. H. Hoover, T. K. Miller Webster, W. V. Thayne, and G. Licitra. 1999. Degradation of two protein sources at three solids retention times in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 77:485-491.
- Valdés, C., M. D. Carro, M. J. Ranilla, and J. S. González. 2000. Effect of forage to concentrate ratio in complete diets fed to sheep on voluntary feed intake and some digestive parameters. *Anim. Sci.* 70:119-126
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., and Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Vlaeminck, B, V. Fievez, D. Demeyer, and R. J. Dewhurst. 2006. Effect of forage:concentrate ratio on fatty acid composition of rumen bacteria isolated from ruminal and duodenal digesta. *J. Dairy Sci.* 89:2668–2678.



#### ***4.4. Prueba 4***

*Evaluation of procedures for detaching  
particle-associated microbes from forage and concentrate  
incubated in Rusitec fermenters: Efficiency of recovery  
and representativeness of microbial isolates*





**Evaluation of procedures for detaching particle-associated microbes from forage and concentrate incubated in Rusitec fermenters: Efficiency of recovery and representativeness of microbial isolates**

M.E. Martínez, M.J. Ranilla, S. Ramos, M.L. Tejido, C. Saro  
and M.D. Carro

Departamento de Producción animal, Universidad de León,  
24007 León, Spain

*Journal of Animal Science* 87:2064-2072  
doi:10.2527/jas.2008-1634



**ABSTRACT:** Three detachment procedures (DP) were evaluated for their ability to remove particle-associated microbes (PAM) from digesta in Rusitec fermenters fed a 30:70 alfalfa hay:concentrate diet. Forage and concentrate were incubated in separate nylon bags, and incubation residues were treated independently. Microbial biomass was labeled with  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ . Treatments were: 1) MET: residues were incubated at 38°C for 15 min with saline solution (0.9% NaCl) containing 0.1% methylcellulose with continuous shaking; 2) STO: residues were mixed with cold saline solution and homogenized with a stomacher for 5 min at 230 revolutions/min; 3) FRE: residues were immediately frozen at -20°C for 72 h, thawed at 4°C, mixed with saline solution and subjected to STO procedure. Common to all treatments was storing at 4°C for 24 h after the treatment, homogenization, filtration, and resuspension of residues 2 times in the treatment solutions. Microbial pellets were obtained by centrifugation, and microbial removal was estimated indirectly by measuring removal of  $^{15}\text{N}$ . The PCR-single-stranded conformation polymorphism analysis of the 16S ribosomal DNA was used to analyze the similarity between microbial communities attached to the substrate and those in the pellet obtained after each DP. There were no feed x DP interactions ( $P = 0.16$  to  $0.96$ ) for any variable, except for N content in microbial pellets ( $P = 0.02$ ). Both detaching efficiency ( $P = 0.004$ ) and total recovery ( $P = 0.01$ ) were affected by DP, with STO showing the greatest values (mean values across substrates of 64.1% for detaching efficiency and 58.3% for total recovery) and MET the lowest ones (57.0 and 51.8%). Similarity index between the microbes attached to substrates and those in the pellets were affected ( $P = 0.02$ ) by DP, with MET showing greater ( $P < 0.02$ ) values (84.0 and 86.4% for forage and concentrate, respectively) than FRE (72.5 and 67.8%) and STO having intermediate values (77.1 and 82.4%). There were no differences ( $P = 0.70$ ) among PAM pellets in their N content, but MET pellets had greater ( $P < 0.05$ )  $^{15}\text{N}$  enrichments than those obtained by STO and FRE. Although STO was the most effective method to detach ruminal microbes from both concentrate and forage, MET produced pellets with the greater similarity to the microbial communities attached to the substrates and therefore could be considered the most appropriate DP method for treating digesta from Rusitec fermenters.

**Key words:** detachment,  $^{15}\text{N}$ , ruminal microbes, microbial diversity

## INTRODUCTION

Methods of estimating ruminal microbial protein synthesis rely on marker techniques in which a particular microbial constituent is related to the microbial N content. Although differences between liquid-associated (LAM) and particle-associated microorganisms (PAM) in marker:N ratio are widely demonstrated (Merry and McAllan, 1983; Carro and Miller, 2002; Molina-Alcaide et al., 2008), in many studies marker:N has been established in LAM. Because PAM can be more than 70% of bacterial flow leaving the rumen (Yang et al., 2001; Ipharraguerre et al., 2007), their contribution should be taken into account to estimate microbial protein synthesis. Common procedures to detach PAM have efficiencies ranging from 20 (Leagy-Carmier and Bauchart, 1989; Olubobokun and Craig, 1990) to 90% (Whitehouse et al., 1994; Ranilla and Carro, 2003; Trabalza-Marinucci et al., 2005), but recovery of detached microbes is usually less than 55%, indicating that a pure PAM preparation may not represent the total PAM. To our knowledge, no studies have compared different detachment procedures (DP) in their efficacy to obtain a representative microbial pellet. Molecular fingerprinting techniques such as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), or single strand conformation polymorphism (SSCP) have been used to investigate microbial diversity in the gut. These techniques could evaluate similarity between microbial communities attached to substrate and those in the pellet after DP.

We hypothesized that DP could affect the microbial community composition of pellets, and therefore the marker:N ratio and the estimate of microbial growth. We investigated the efficiency of recovery of PAM from ruminal digesta using 3 DP, and compared pellets obtained with microbes attached to substrate before the DP. The study was conducted in Rusitec fermenters fed forage and concentrate into separate nylon bags to test DP on 2 different substrates.

## MATERIALS AND METHODS

### *Apparatus, Diet and Experimental Procedure*

One 15-d incubation trial was carried out using 4 Rusitec fermenters with an effective volume of 600 mL each. The general incubation procedure was as described

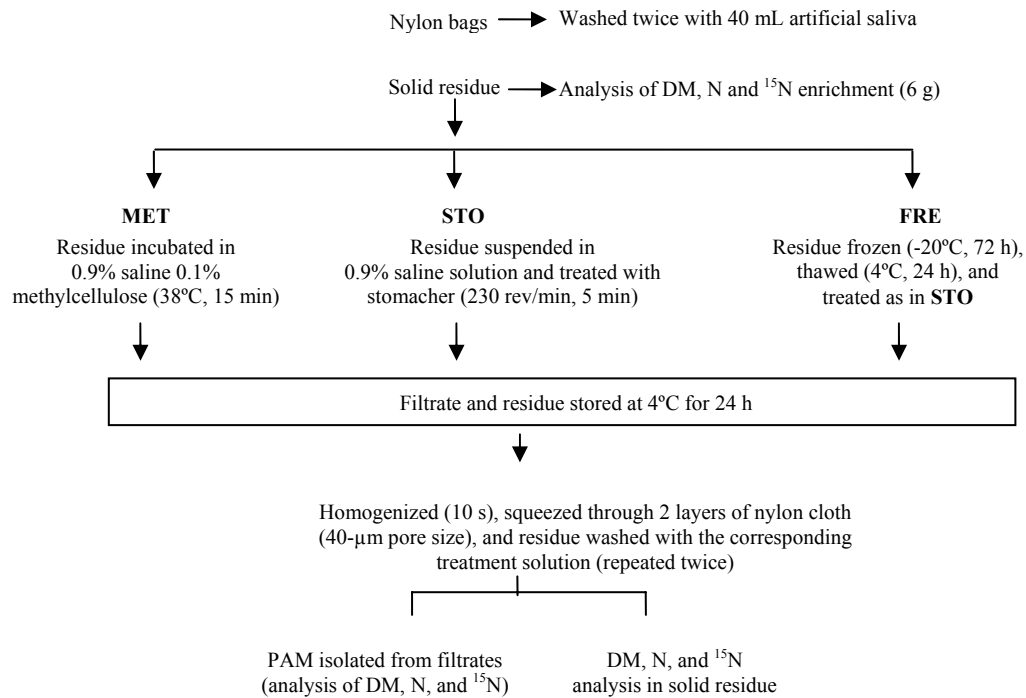
by Giraldo et al. (2007). All fermenters received daily 30 g of DM of a 30:70 alfalfa hay:concentrate diet (92.5 % DM). The concentrate was based on barley, gluten feed, wheat middlings, soybean meal, palmkern meal, wheat, corn, and mineral/vitamin premix in the proportions of 21.5:20.4:20:13.5:11.5:5:5:3.1 (air-dried basis). The diet contained 91.3% OM, 17.3% CP, 37.4% NDF, and 18.7% ADF (DM basis), and was formulated according to the NRC (1985) guidelines to meet or exceed current nutrient recommendations for lactating sheep. Hay was chopped (approximately 0.5-cm pieces), and the concentrate was ground through a 3-mm sieve. Forage (FOR) and concentrate (CON) were fed into separate nylon bags (100- $\mu$ m pore size) containing 9 and 21 g of DM, respectively.

The inoculum was obtained from 4 ruminally fistulated sheep fed the same diet administered to the fermenters. Sheep were managed according to the protocols approved by the León University Institutional Animal Care and Use Committee. Ruminal contents were collected from each sheep immediately before feeding in the morning, pooled, strained through 4 layers of cheesecloth, and transferred to the *in vitro* system within 30 min as previously described (Carro et al., 1992). On the first day of the experiment, each fermenter was inoculated with 250 mL of strained rumen fluid, 250 mL artificial saliva, and 80 g of solid rumen content supplied into a nylon bag. Two nylon bags containing FOR and CON were also incubated in each fermenter. On the second day the original solid inoculum was removed, and 2 bags with FOR and CON were supplied. On subsequent days, the bags that had spent 2 d in the fermenters were removed, and 2 new bags with feed were introduced. This procedure was repeated every morning to achieve an incubation time of 48 h. Flow through the fermenters was maintained by continuous infusion of McDougall (1948) artificial saliva (pH = 8.4) at a rate of 550 mL/d (dilution rate of 3.82%/h). On d 8, a pulse dose of 3.5 mg of  $^{15}\text{N}$  (98% enriched  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ; Tracer SA, Madrid, Spain) was added into each fermenter to label the ammonia-N pool. From d 8 to 15, a solution of  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  was added to the artificial saliva at a rate of 6.0 mg of  $^{15}\text{N/L}$ .

On d 13, 14, and 15, the residues of the nylon bags collected from each of the 4 fermenters were subjected to 3 different DP to obtain PAM. Each day the nylon bags were washed twice with 40 mL of artificial saliva, and their content was emptied, mixed by substrate (FOR and CON) and weighed. One sample (about 6 g fresh matter) was

taken, frozen, and lyophilized to determine DM, non-ammonia N (NAN), and  $^{15}\text{N}$  enrichment. The rest of the residue (about 50 and 90 g of fresh matter for forage and concentrate, respectively) was divided into 3 equal portions and subjected to one of the following treatments (see Figure 4.4.1.): 1) MET: the residue was incubated with saline solution (0.9% NaCl) containing 0.1% methylcellulose at 38°C for 15 min in a continuous-shaking water bath (65 strokes/min), then 25 mL of cold (4°C) saline solution containing 0.1% methylcellulose were added, and the material was stored at 4°C for 24 h; 2) STO: the residue was mixed with saline solution (0.9% NaCl), placed in Stomacher standard bags and homogenized with a Stomacher 400 Circulator (Seward Ltd., London, UK) for 5 min at 230 revolutions/min, then 25 mL of cold (4°C) saline solution were added, and the material was stored at 4°C for 24 h; 3) FRE: the residue was immediately frozen at -20°C for 72 h, thawed at 4°C for 24 h, mixed with saline solution (0.9% NaCl), and treated as described for STO. All solutions were added at a rate of 3 mL/g of residue. Following treatments, the samples were homogenized for 10 s with a Waring Blender, filtered through 2 layers of nylon cloth (40- $\mu\text{m}$  pore size), and the filtrates were removed and retained. The residues were resuspended twice in the corresponding treatment solutions and homogenized. The final filtrates were then centrifuged in previously weighed tubes at 29,000  $\times g$  for 25 min at 4°C to obtain microbial pellets. These were washed by resuspension in 20 mL of saline solution and the centrifugation was repeated. Microbial pellets were lyophilized, and centrifuge tubes were weighed to calculate the total DM amount of microbial pellet recovered. Microbial pellets were ground to a fine powder with a mortar and pestle, and analyzed for N and  $^{15}\text{N}$  enrichment. The final residue from the contents of the nylon bags was weighed, frozen, and lyophilized for determination of DM, NAN, and  $^{15}\text{N}$  enrichment. The FOR and CON were also analyzed for their natural  $^{15}\text{N}$  content (0.3667 and 0.3677% of N, respectively), and the value was used for background correction before  $^{15}\text{N}$  infusion.

On each sampling day, the daily liquid effluent was collected and pooled. One sample (about 300 mL) was frozen and lyophilized for determination of DM, NAN, and  $^{15}\text{N}$  enrichment. About 500 mL of effluent was used for isolation of LAM by centrifugation following the procedure described above for PAM. Microscopic examination of microbial pellets (PAM and LAM) showed that they were essentially free from feed particles.



**Figure 4.4.1.** Procedures used to detach and isolate particle-associated ruminal Microorganisms (PAM) from nylon bag residues in Rusitec fermenters.

### *Analyses of Microbial Diversity by SSCP*

To analyze the similarity between microbial communities attached to the substrate and those in the pellet obtained after the different DP, DNA was isolated from both incubated feed residues (FOR and CON; 120 mg of DM) and microbial pellets (30 mg of DM) as described by Yu and Morrison (2004). A fragment of 16S ribosomal DNA (rDNA) gene was amplified from DNA extracts by PCR using primers specific to the V3-4 region, B342If, and U806Ir (Hori et al., 2006), in which the reverse primer was phosphorylated at the 5'-end. Each PCR mix (100 µL final volume) contained 1 x PCR reaction buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 µM of each primer (synthesized by Sigma; Madrid, Spain), each deoxynucleoside triphosphate at a concentration of 0.2 mM, and 5 U of Taq Polymerase (Biotools, Madrid, Spain). Thermocycling was conducted in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA), and started with an initial cycle of denaturation (94°C for 5 min), followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 60 s), annealing (50°C for 60 s), and elongation (72°C for 90 s), ending with a final extension step at 72°C for 4 min. The PCR products were analyzed for size and quantity

by electrophoresis in 1.5% agarose gels, and further purified using a Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Eluted DNA was quantified fluorimetrically using a Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Single-stranded DNA was obtained from the PCR products removing the 5'-phosphorylated strand by  $\lambda$ -exonuclease digestion. Up to 1  $\mu$ g DNA was digested for 90 min at 37°C in a total volume of 40  $\mu$ L, with 2.5 U  $\lambda$ -exonuclease in 1 X exonuclease buffer (New England Biolabs, Beverly, MA). The digestion was stopped with the first step of the purification with spin columns of the MiniElute DNA cleanup system (Qiagen, Hilden, Germany).

The SSCP was performed in a 0.625% MDE (mutation detection enhancement) gel (BioScience Rockland, Inc., Rockland, ME) in 1 X TBE (tris-borate-EDTA) buffer using a DCode system (Biorad, El Prat de Llobregat, Spain). Before loading, samples were denatured in buffer (10 mM NaOH, 0.25% xylene cyanol, 0.25% bromophenol blue, and 95% formamide) at 95°C for 3 min, and subsequently cooled on ice for 3 min. Electrophoresis was performed at 20°C at 15 mA for 20 h. The SSCP profiles were visualized by silver staining (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), and gel images were recorded using a GS-800 Calibrated Imaging Densitometer (Biorad, El Prat de Llobregat, Spain).

### ***Analytical Procedures***

Dry matter (method ID 934.01), ash (method ID 942.05), and CP (method ID 984.13) were determined according to AOAC (1999). Analyses of NDF and ADF were carried out according to Van Soest et al. (1991) by sequential analyses on the same sample and using an ANKOM220 Fiber Analyzer unit (ANKOM Technology Corporation, Macedon, NY). Preparation of samples for  $^{15}\text{N}$  analysis of feed residues and microbial pellets have been reported by Carro and Miller (1999). Analyses of  $^{15}\text{N}$  were performed by isotope ratio mass spectrometry as described by Barrie and Workman (1984).

### ***Calculations and Statistical Analysis***

The proportion of detached microbes (% detachment) for each DP was calculated as  $[1 - (\mu\text{g of } ^{15}\text{N in total residue after treatment} / \mu\text{g of } ^{15}\text{N in total residue before})]$



treatment) x 100]. The proportion of recovery from detached microbes (% recovery) was calculated as  $[\mu\text{g of }^{15}\text{N in total microbial pellet} / (\mu\text{g of }^{15}\text{N in total residue before treatment} - \mu\text{g of }^{15}\text{N in total residue after treatment}) \times 100]$ . The total recovery was calculated as  $[(\% \text{ detachment} \times \% \text{ recovery}) / 100]$ .

Daily PAM synthesis was estimated as: total NAN production in nylon bag residues  $\times$  ( $^{15}\text{N}:\text{N}$  in residues/ $^{15}\text{N}:\text{N}$  in PAM). Daily LAM synthesis was estimated as: total NAN production in the effluent  $\times$  ( $^{15}\text{N}:\text{N}$  in effluent/ $^{15}\text{N}:\text{N}$  in LAM). Total daily microbial production was calculated as the sum of the flows of PAM and LAM.

Comparative analyses of PCR-SSCP profiles were achieved using Quantity One software (Biorad, El Prat de Llobregat, Spain). The banding profiles on the SSCP gel reflect the predominant bacterial species or populations present in substrates and microbial isolates. To analyze the representativeness of the microbial isolates, a percent similarity index was calculated from the banding profiles of each substrate and the corresponding isolated pellets, considering only the presence/absence of the different bands. The Shannon's diversity index was calculated as described by Shannon and Weaver (1949), and was used to evaluate the diversity of rumen microbial communities in samples of FOR and CON.

Data were analyzed according to a repeated measures model using the MIXED procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). The effects of DP, substrate, and DP x substrate were considered fixed, and day was considered a random effect. Mean effects were declared significant at  $P < 0.05$ , and  $P < 0.10$  values were considered as trends and discussed. Differences in Shannon diversity index between FOR and CON samples were assessed by a Student *t*-test.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Based on the results from a previous study comparing several chemical treatments to detach PAM (Ranilla and Carro, 2003), we chose the treatment that showed the best detachment efficacy (MET) and decided to compare it with 2 physical treatments (STO and FRE). Homogenization and chilling at 4°C were included in all treatments due to their efficacy to remove PAM from ruminal digesta (Minato and Suto, 1978; Martín-Orúe et al., 1998; Trabalza-Marinucci et al., 2005). Because it has been shown that

efficiency of DP can be affected by the nature of the treated substrate (Olubobokun et al., 1990; Ranilla and Carro, 2003), we decided to incubate FOR and CON separately in Rusitec fermenters to test the efficiency of the selected DP on both substrates.

As shown in Table 4.4.1., there were differences among DP in both percentage of detachment ( $P = 0.004$ ) and total recovery ( $P = 0.01$ ), but no differences ( $P = 0.84$ ) were detected in the recovery of detached PAM. No interaction between DP and substrate was found ( $P = 0.77$  to  $0.96$ ) for any of these variables. The MET treatment of FOR produced detachment values similar to the 66.3% mean value reported by Martín-Orúe et al. (1998) for ruminal digesta from sheep fed 2 diets differing in forage:concentrate ratio, but values for CON were lower in the present study (48.6%). Ranilla and Carro (2003) reported greater detachment values for MET treatment of digesta from Rusitec fermenters fed 80:20 and 20:80 forage:concentrate diets (80.5 and 86.0%, respectively). These discrepancies in the values observed in different experiments could be due to differences either in the DP or in the microbial species attached to the substrates. Ranilla and Carro (2003) used a 0.1% methylcellulose solution at pH 2.0, whereas the pH of the solution used in the present study was 7.0. It has been shown that the attachment of *Fibrobacter succinogenes* to cellulose decreased from pH 6.0 to 4.5 (Roger et al., 1990), whereas the adhesion of *Ruminococcus flavefaciens* remained stable at pH between 3.5 and 9.0 (Rasmussen et al., 1989; Roger et al., 1990). In addition, it has been reported that the incubation with a 0.1% methylcellulose solution inhibited the adhesion of *R. flavefaciens* to cellulose, but had no effects on *F. succinogenes* (Rasmussen et al., 1989; Roger et al., 1990), which suggests that mechanisms of adherence differ among bacterial species. These results seem to indicate that the efficiency of DP could be affected by the bacterial species attached to the substrate, which helps to explain the differences found in the previously cited studies.

Detachment values for STO were 1.09 and 1.17 times greater ( $P = 0.02$  and  $0.004$ , respectively) than those obtained by MET for FOR and CON, respectively. Stomaching has been reported to be an efficient DP in some studies (Merry and McAllan, 1983), whereas a lack of effect has been reported in others (Legay-Carmier and Bauchart, 1989; Trabalza-Marinucci et al., 2005). Differences in the type of substrate, microbial populations, and in the time and intensity of the treatment with the stomacher could

explain the variability of results from different studies. Freezing the digesta before STO treatment (FRE) did not increase the percentage of detachment compared to either STO ( $P = 0.20$ ) or MET ( $P = 0.16$ ). This agrees with the results of Trabalza-Marinucci et al. (2005), who pointed out that freezing digesta at  $-30^{\circ}\text{C}$  for 24 h before DP did not improve the efficacy of any of the tested DP.

**Table 4.4.1.** Percentage of detachment, recovery of detached, and total recovery of particle-associated microbes from forage (FOR) and concentrate (CON) incubated in Rusitec fermenters after applying different detachment procedures as determined using  $^{15}\text{N}$  as microbial marker, and similarity index of PCR single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) profiles between substrates and microbial pellets

Item	Substrate	Detachment procedure (DP) <sup>1</sup>				SEM	<i>P</i> value		
		MET	STO	FRE	Substrate		DP	Substrate x DP	
Detachment, %	FOR	65.3 <sup>a</sup>	71.5 <sup>b</sup>	68.6 <sup>ab</sup>	1.46	0.04	0.004	0.77	
	CON	48.6 <sup>a</sup>	56.8 <sup>b</sup>	53.4 <sup>ab</sup>					
Recovery, %	FOR	90.3	92.0	90.0	2.94	0.87	0.84	0.82	
	CON	92.0	90.0	89.0					
Total recovery, %	FOR	58.9 <sup>a</sup>	65.7 <sup>b</sup>	61.6 <sup>ab</sup>	1.56	0.03	0.01	0.96	
	CON	44.8 <sup>a</sup>	50.8 <sup>b</sup>	47.6 <sup>ab</sup>					
Similarity index, %	FOR	84.0 <sup>b</sup>	77.1 <sup>ab</sup>	72.5 <sup>a</sup>	2.80	0.91	0.02	0.66	
	CON	86.4 <sup>b</sup>	82.4 <sup>b</sup>	67.8 <sup>a</sup>					

<sup>a, b</sup> Within a row, means without a common superscript letter differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> MET: residue incubated in 0.9% saline 0.1% methylcellulose ( $38^{\circ}\text{C}$ , 15 min); STO: residue suspended in 0.9% saline solution and treated with stomacher (230 revolutions/min, 5 min); FRE: residue frozen ( $-20^{\circ}\text{C}$ , 72 h), thawed ( $4^{\circ}\text{C}$ , 24 h), and treated as in STO

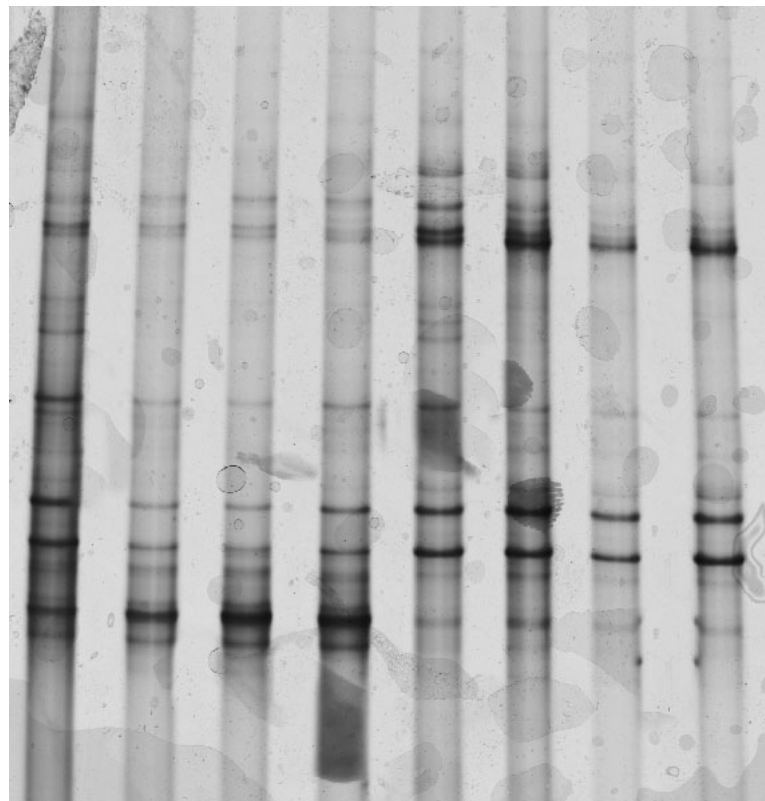
The lack of differences among DP in the values of recovery ( $P = 0.84$ ) would indicate that the procedures either did not have an adverse effect on microbial cell integrity or they impacted it with the same intensity. The values of recovery (89.0 to 92.0 %) were greater than those found in other studies (Craig et al., 1987; Martin-Orue et al., 1998), and suggest that our DP produced low cell lysis. However, it has to be taken into account that N compounds are located in both the cytoplasm and the cell wall

and, therefore, the  $^{15}\text{N}$  enrichment could not be as strongly affected by cellular lysis as other microbial markers that are located only either in the cell wall (e.g. diaminopimelic acid, amino ethyl phosphonic acid) or in the cytoplasm (e.g. purine bases, pyrimidines).

The values of total recovery ranged from 58.9 to 65.7% for FOR and from 44.8 to 50.8% for CON, being greater for FOR than for CON ( $P = 0.03$ ). Ranilla and Carro (2003) reported values of total PAM recovery from 54.2 to 55.8% and from 32.2 to 37.3% after treating digesta from Rusitec fermenters fed 80:20 and 20:80 alfalfa hay:concentrate diets, respectively, with different chemical DP. In contrast, lower values of total recovery (17.3 to 22.0%) have been reported by Martín-Orúe et al. (1998) using extraction solutions with NaCl, methylcellulose, or tertiary butanol to detach PAM from ruminal digesta taken from sheep fed 80:20 and 20:80 straw:barley grains diets at 1 and 6 h after feeding. In agreement with these results, Craig et al. (1987a) observed that only 32% of PAM were recovered from ruminal digesta of cows fed a 65% hay diet when samples were taken 1 h after feeding, and Olubobokun et al. (1988) reported that 34.0 and 32.9% of PAM were recovered from ruminal digesta taken 2 h after feeding from steers receiving 100% alfalfa hay and 40% alfalfa hay diets, respectively. One factor that could help to explain the greater total recovery observed in the studies with Rusitec fermenters compared to those *in vivo* is the time of sampling. In Rusitec fermenters, nylon bags are removed daily after 48 h of incubation, and microbial attachment could be less tenacious at this time than soon after feeding (Leedle et al., 1982). In agreement with this hypothesis, Craig et al. (1987a) and Olubobokun and Craig (1990) observed that the proportion of PAM recovered from ruminal digesta in cattle increased with time after feeding, with the lowest recoveries observed 1 to 3 h after feeding.

Although many studies have investigated the efficiency of different DP, to the best of our knowledge their effects on the profile of the microbial communities of the pellets obtained have not yet been tested. Figure 4.4.2. shows the PCR-SSCP profiles of incubated FOR and CON and of the pellets obtained by the 3 DP using samples taken on d 13 as an example. The community profiles obtained include up to 22 and 18 sharp bands for FOR and CON, respectively, an indication of community complexity. Similarity indexes between microbial communities attached to FOR and CON and those in the pellets differed with the DP (Table 4.4.1.). The MET pellets had greater similarity

to PAM attached to the substrates than FRE pellets ( $P < 0.03$  and  $0.003$  for FOR and CON, respectively), but similarity indexes for both substrates were not different ( $P = 0.14$  and  $0.37$ ) to those shown by STO pellets. These results suggest that freezing could have destroyed cell integrity of some bacterial species, thus reducing the microbial diversity present in the pellets. Similar results are shown by the dendrograms based on the matrix of similarity (see Figure 4.4.3.), where in general FRE pellets clustered separately from PAM for both incubated substrates. This molecular approach reveals a relatively high similarity between the microbial communities attached to the substrates and those detached and recovered in the microbial pellets, being MET and STO pellets more representative than FRE.

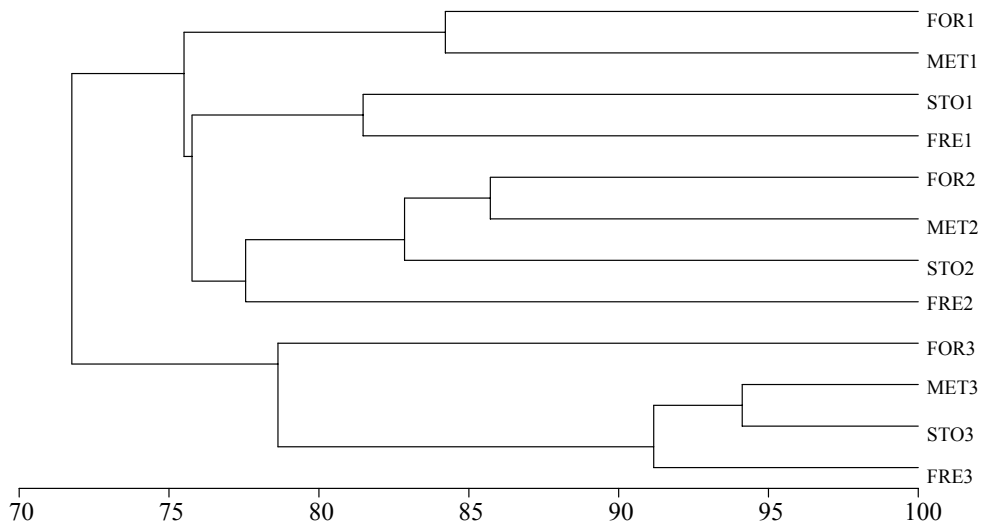


**FOR MET STO FRE CON MET STO FRE**  

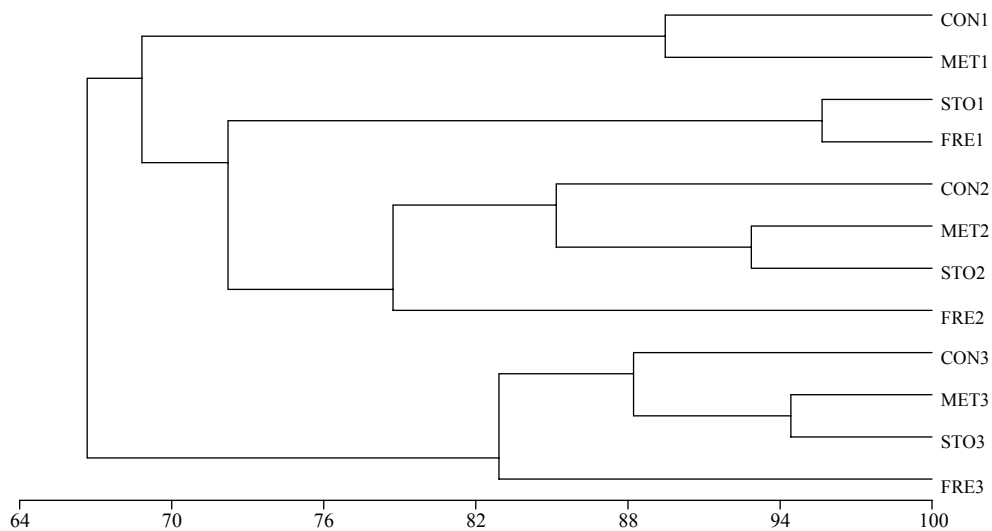

---

**Forage Concentrate**

**Figure 4.4.2.** Original PCR single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) gel showing profiles of microbial communities attached to forage (FOR) and concentrate (CON) incubated in Rusitec fermenters and those in the pellet obtained after different detachment procedures (MET: residue incubated in 0.9% saline 0.1% methylcellulose (38°C, 15 min); STO: residue suspended in 0.9% saline solution and treated with stomacher (230 revolutions/min, 5 min); FRE: residue frozen (-20°C, 72 h), thawed (4°C, 24 h), and treated as in STO). Samples shown as example were taken on d 13.



#### Forage (FOR)



#### Concentrate (CON)

**Figure 4.4.3.** Dendrograms of PCR single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) profiles of microbial communities attached to forage (FOR) and concentrate (CON) incubated in Rusitec fermenters and those in the pellet obtained after different detachment procedures (**MET**: residue incubated in 0.9% saline 0.1% methylcellulose (38°C, 15 min); **STO**: residue suspended in 0.9% saline solution and treated with stomacher (230 rev/min, 5 min); **FRE**: residue frozen (-20°C, 72 h), thawed (4°C, 24 h), and treated as in **STO**). Numbers (1, 2, and 3) indicate sampling days.

In the present study the level of detachment was greater ( $P = 0.04$ ) for FOR compared to CON for all treatments (mean values of 68.9 and 52.9%, respectively; Table 4.4.1.). These results would indicate that PAM population attached to FOR showed a lower resistance to detachment, which could be related partly to the greater particle size of FOR particles (Legay-Carmier and Bauchart, 1989). The N content of PAM (Table 4.4.2.) was in the range of the values previously reported in the literature for microbes detached from ruminal digesta in cows (Clark et al., 1992), sheep (Martín-Orúe et al., 1998), and fermenters (Carro and Miller, 2002; Ranilla and Carro, 2003). For all DP, pellets detached from CON had lower ( $P = 0.01$ ) N content and tended ( $P < 0.08$ ) to present greater  $^{15}\text{N}$  enrichments compared to those detached from FOR, which agrees with previous work showing that in mixed ruminal bacteria the N content declined as concentrate in the diet increased (McAllan and Smith, 1977). These results indicate that different microbial communities were attached to FOR and CON. This is further suggested by the fact that the similarity index between FOR and CON was  $75.7 \pm 3.23\%$ . In addition, Shannon index values were greater ( $P = 0.02$ ) for FOR compared to CON (2.95 and 2.74, respectively; values not shown), which would indicate a greater diversity of the PAM population attached to FOR. This greater diversity correlates with the comparatively greater amount of PAM found in close association with FOR compared to CON (see Table 4.4.2.) considering that the diet contained only 30% of FOR. The PAM accounted for 67.1% of total NAN in FOR digesta, whereas in CON digesta PAM accounted for only 39.9% of total NAN ( $P < 0.001$ ; results not shown).

Although no differences ( $P = 0.70$ ) among DP were detected in N content of pellets, for both substrates, MET pellets showed a greater  $^{15}\text{N}$  enrichment than STO pellets ( $P = 0.03$  and  $<0.001$  for FOR and CON, respectively), and tended to show greater enrichments than those obtained with FRE ( $P = 0.06$  and  $0.07$  for FOR and CON, respectively). The  $^{15}\text{N}$  enrichment in bacteria depends on their ability to use free ammonia as the N source and on the  $^{15}\text{N}$  enrichment of the ammonia fraction. Because the 3 DP were applied to the same original sample, the observed differences cannot be attributed to differences in ammonia- $^{15}\text{N}$  enrichment. A higher proportion of species that preferentially incorporate ammonia-N in the PAM pellet obtained with MET might explain the greater  $^{15}\text{N}$  enrichment compared to the other DP. This is in agreement with the results of Ranilla and Carro (2003), who observed greater ammonia- $^{15}\text{N}$

incorporation by PAM obtained with MET compared to PAM obtained with different chemical solutions.

**Table 4.4.2.** Nitrogen content and  $^{15}\text{N}$  enrichment of microbial pellets obtained from forage (FOR) and concentrate (CON) incubated in Rusitec fermenters after applying different detachment procedures, and growth of particle-associated microorganisms (PAM) estimated using as reference the different microbial pellets (see text for calculations)

Item	Substrate	Detachment procedure (DP) <sup>1</sup>				P value		
		MET	STO	FRE	SEM	Substrate	DP	Substrate x DP
N, mg/g DM	FOR	62.2	63.6	64.2	0.97	0.01	0.70	0.41
	CON	55.9	55.9	55.2				
$^{15}\text{N}$ , atoms% in excess	FOR	0.141 <sub>h</sub>	0.126 <sub>a</sub>	0.129 <sub>a</sub>	0.0041	0.08	0.002	0.16
	CON	0.166 <sub>h</sub>	0.136 <sub>a</sub>	0.154 <sub>h</sub>				
PAM, mg of microbial N/d	FOR	39.9 <sub>a</sub>	45.1 <sup>b</sup>	43.9 <sub>ab</sub>	1.57	0.003	<0.001	0.02
	CON	73.0 <sup>a</sup>	89.2 <sup>c</sup>	78.7 <sup>b</sup>				
PAM, % of total microbial N	FOR	15.3	16.0	16.3	0.515	0.003	0.009	0.03
	CON	28.0 <sub>a</sub>	31.7 <sub>b</sub>	29.2 <sup>b</sup>				

<sup>a, b</sup> Within a row, means without a common superscript letter differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> MET: residue incubated in 0.9% saline 0.1% methylcellulose (38°C, 15 min); STO: residue suspended in 0.9% saline solution and treated with stomacher (230 revolutions/min, 5 min); FRE: residue frozen (-20°C, 72 h), thawed (4°C, 24 h), and treated as in STO.

In agreement with previous results (Merry and McAllan, 1983; Carro and Miller, 2002), LAM presented greater N content (69.6 mg/g DM) and  $^{15}\text{N}$  enrichment (0.2547 atoms% in excess) compared to PAM. The mean value of daily LAM growth measured over the 3 d of sampling was  $147 \pm 1.0$  mg of microbial N (values not shown), and PAM represented 43.3, 47.7, 45.5% of the total microbial pool when MET, STO, and FRE pellets were used for calculations, respectively (Table 4.4.2.). These values were lower than those found by Merry and McAllan (1983) in steers receiving diets of equal proportions of forage and concentrate, and by Yang et al. (2001) in cows fed high-forage diets, but it should be noticed that diets with low forage:concentrate ratio are usually detrimental for the pool of PAM because less fibrolytic bacteria attach to forage



particles (Yang et al., 2001). In addition, our lower values could be due to the different experimental conditions. Ruminal DM content can vary with several factors, ranging from 10 to 25%, whereas in our experiment with Rusitec fermenters the DM content of the digesta represented only about 5% of the total volume.

The use of the different DP affected the estimates of PAM synthesis. The estimates with STO treatment were 1.13 and 1.22 greater ( $P = 0.05$  and  $< 0.001$ ) than those obtained with MET for FOR and CON, respectively. No differences ( $P = 0.60$ ) in PAM synthesis were found between STO and FRE treatments for FOR, but values for CON were 1.13 times greater ( $P = 0.002$ ) for STO compared to FRE. These results suggest that the DP used to isolate PAM affect the estimates of microbial protein synthesis, and could influence the interpretation of results when comparing diets with different forage:concentrate ratios.

## CONCLUSIONS

Results indicate that the treatment of ruminal digesta from Rusitec fermenters with STO combined with homogenizing and chilling at 4°C for 24 h removed more than 70 and 56% of PAM from forage and concentrate, respectively. The PAM constituted about 45% of the ruminal microbial population in the fermenters, and therefore their contribution should be taken into account to estimate total microbial growth. As assessed by PCR-SSCP, the similarity indexes between the microbial communities attached to the substrates and those in the pellets obtained after each detachment procedure indicated that MET was the method that produced a more representative pellet, with similarity indexes greater than of 83.0% for both substrates. The results indicate that the percentage of detachment and recovery should not be used as the only criteria to evaluate detachment procedures. Although the detachment efficiency of MET was 8.7 and 14.4% lower than that for STO, the greater similarity indexes seem to indicate that MET could be considered the most appropriate of the analyzed methods for treating digesta from Rusitec fermenters. Further research combining MET and STO procedures is needed to develop an efficient detachment procedure that produces pellets highly representative of the microbial communities attached to digesta.

## LITERATURE CITED

- AOAC. 1999. Official Methods of Analysis, 16th ed., 5th rev. Assoc. Off. Anal. Chem., Gaithersburg, MD.
- Barrie, S., and C. T. Workman. 1984. An automated analytical system for nutritional investigations using N-15 tracers. *Spectros. Int. J.* 3:439-447.
- Carro, M. D., P. Lebzien, and K. Rohr. 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., and E. L. Miller. 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.* 82:149-157.
- Carro, M. D., and E. L. Miller. 2002. Comparison of microbial markers (<sup>15</sup>N and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. *Anim. Sci.* 75:315-321.
- Clark, J. H., T. H. Klusmeyer, and M. R. Cameron. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75:2304-2323.
- Craig, W. M., G. A. Broderick, and D. B. Ricker. 1987. Quantization of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. *J. Nutr.* 117:56-62.
- Giraldo, L.A., M. J. Ranilla, M. J. Tejido, and M. D. Carro. 2007. Influence of exogenous fibrolytic enzyme and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters. *Br. J. Nutr.* 98:753-761.
- Hori, T., S. Haruta, Y. Ueno, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2006. Direct comparison of single- strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16rRNA gene fragments. *J. Microbiol. Methods* 66:165-169.
- Ipharraguerre, I. R., S. M. Reynal, M. Liñeiro, G. A. Broderick, and J. H. Clark. 2007. A comparison of sampling sites, digesta and microbial markers, and microbial references for assessing the postruminal supply of nutrients in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1904-1919.
- Leedle, J. A. Z., M. P. Bryant, and R. B. Hespell. 1982. Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low- or high-forage diets. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:402-412.

- Legay-Carmier, F., and D. Bauchart. 1989. Distribution of bacteria in the rumen contents of dairy cows given a diet supplemented with soya-bean oil. *Br. J. Nutr.* 61:725-740.
- Martín-Orúe, S. M., J. Balcells, F. Zakraoui, and C. Castrillo. 1998. Quantification and chemical composition of mixed bacteria harvested from solid fractions of rumen digesta: effect of detachment procedure. *Anim. Feed Sci. Technol.* 71:269-282.
- McAllan, A. B., and R. H. Smith. 1977. Some effects of variation in carbohydrate and nitrogen intakes on the chemical composition of mixed rumen bacteria from young steers. *Br. J. Nutr.* 37:55-61.
- McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43(1):99-109.
- Merry, R. J., and A. B. McAllan. 1983. A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta. *Br. J. Nutr.* 50:701-709.
- Minato, H., and T. Suto. 1978. Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. II. Attachment of bacteria isolated from bovine rumen to cellulose powder *in vitro* and elution of bacteria attached therefrom. *J. Gen. Appl. Microb.* 24:1-16.
- Molina-Alcaide, E., A. Moumen, I. Martín García, and M. D. Carro. 2008. Comparison of bacterial pellets and microbial markers for the estimation of the microbial nitrogen and amino acids flows from single flow continuous culture fermenters fed diets containing two-stage olive cake. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. doi: 10.1111/j.1439-0396.2008.00834.x.
- NRC. 1985. *Nutrient Requirements of Sheep*. 6th ed. National Academy Press. Washington, DC.
- Olubobokun, J. A., and W. M. Craig. 1990. Quantity and characteristics of microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J. Anim. Sci.* 68:3360-3370.
- Olubobokun, J. A., W. M. Craig, and W. A. Nipper. 1988. Characteristics of protozoal and bacterial fractions from microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J. Anim. Sci.* 66:2701-2710.
- Ranilla, M. J., and M. D. Carro. 2003. Diet and procedures used to detach particulate-associated microbes from ruminal digesta influence chemical composition of

- microbes and estimation of microbial growth in Rusitec fermenters. *J. Anim. Sci.* 81:537-544.
- Rasmussen, M. A., B. A. White, and R. B. Hespell. 1989. Improved assay for quantitating adherence of ruminal bacteria to cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2089-2091.
- Roger, V., G. Fonty, S. Komisarczuk-Bony, and P. Gouet. 1990. Effects of physicochemical factors on the adhesion to cellulose Avicel of the ruminal bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3081-3087.
- Shannon, C. E., and W. Weaver. 1949. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana. 117 pp.
- Trabalza-Marinucci, C. Poncet, E. Delval, and G. Fonty. 2005. Evaluation of techniques to detach particle-associated microorganisms from rumen contents. *Anim. Feed Sci. Technol.* 125:1-16.
- Van Soest, P.J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.
- Whitehouse, N. L., V. M. Olson, C. G. Schwab, W. R. Chesbro, K. D. Cunningham, and T. Lykos. 1994. Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. *J. Anim. Sci.* 72:1335-1343.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. 2001. Effect of dietary factors on distribution and chemical composition of liquid- or solid-associated bacterial populations in the rumen of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 79:2736-2746.
- Yu, Z., and M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Bio. Techniques* 36:808-812.

## ***4.5. Prueba 5***

*Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters.I. Digestibility, fermentation parameters and efficiency of microbial protein synthesis*



**Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. I. digestibility, fermentation parameters and efficiency of microbial protein synthesis**

M.E. Martínez, M.J. Ranilla, M.L. Tejido, S. Ramos and  
M.D. Carro

*Departamento de Producción Animal, Universidad de León,  
24071 León (Spain)  
Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas  
s/n. 24346 Grulleros, León (Spain)*

***Journal of Dairy Science (En evaluación)***





## ABSTRACT

Four ruminally and duodenally cannulated sheep and 8 Rusitec fermenters were used to determine the effects of forage to concentrate (F:C) ratio and type of forage in the diet on ruminal fermentation and microbial protein synthesis. The purpose of the study was to assess how closely fermenters can mimic the dietary differences found *in vivo*. The 4 experimental diets contained F:C ratios of 70:30 or 30:70 with either alfalfa hay or grass hay as the forage, and microbial growth was determined in both systems using  $^{15}\text{N}$  as a microbial marker. Rusitec fermenters detected differences between diets similar to those observed in sheep by changing F:C ratio on pH, neutral-detergent fiber (NDF) digestibility, total volatile fatty acid (VFA) concentrations, molar proportions of acetate, propionate, butyrate, isovalerate and caproate and amylase activity. In contrast, Rusitec fermenters did not reproduce the dietary differences found in sheep for  $\text{NH}_3\text{-N}$  and lactate concentrations, dry matter (DM) digestibility, proportions of isobutyrate and valerate, carboxymethylcellulase and xylanase activities, and microbial growth and its efficiency. Regarding the effect of the type of forage in the diet, Rusitec fermenters detected differences among diets similar to those found in sheep for most determined parameters, with the exception of pH, DM digestibility, butyrate proportion and carboxymethylcellulase activity. Minimum pH and maximal VFA concentrations were reached at 2 h and at 6-8 h postfeeding in sheep and fermenters, respectively, indicating that feed fermentation was slower in fermenters compared with sheep. There were differences between systems in the magnitude of most of determined parameters. In general, fermenters showed lower lactate concentrations, NDF digestibility, acetate:propionate ratios and enzymatic activities. On the contrary, fermenters showed greater  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentrations, DM digestibility and proportions of propionate, butyrate, isovalerate, valerate and caproate. Values of efficiency of microbial growth were greater in fermenters compared with sheep for 70:30 diets, but they were lower for 30:70 diets. Differences between fermentation in sheep and fermenters can be mainly attributed to the lack of absorption in fermenters, differences in solid retention time, and compartmentalization in Rusitec system. In general, Rusitec system simulated better the *in vivo* fermentation of high-forage diets compared with high-concentrate diets.

**Key words:** Rusitec, sheep, F:C ratio, forage, fermentation, microbial growth

## INTRODUCTION

The interactions between microorganisms and the complexity of the chemical reactions that take place in the rumen make difficult the study of ruminal function under strictly controlled conditions. Moreover, ruminal studies usually require the use of cannulated animals, which comprises ethical and legal problems, besides being laborious and expensive. All these problems have led to the development of *in vitro* systems for simulating ruminal fermentation. Many types of artificial rumen apparatus have been described in the literature, ranging from simple continuous fermentation systems (Weller and Pilgrim, 1974) to complicated fermenters which allow a precise control of pH and liquid and solid turnover rates (Hoover et al., 1976). Studies that have compared *in vitro* with *in vivo* fermentation patterns are rare in the literature, although in the last years several papers have dealt with this topic (Carro et al., 2009; Ziemer et al., 2000; Muetzel et al., 2009). To our knowledge all previous studies have been carried out with continuous flow fermenters (Mansfield et al., 1995; Ziemer et al., 2000; Muetzel et al., 2009) or batch cultures (Gizzi et al., 1998), and only one study has investigated how close the semi-continuous flow Rusitec system mimics the ruminal fermentation (Carro et al., 2009). The Rusitec system was designed by Czerkawski and Breckenridge (1977) as a simple apparatus for maintaining a normal ruminal population under strictly controlled conditions over long periods of time, and it has been widely used in many laboratories over the last decades.

In previous studies conducted at our laboratory (Gómez et al., 2005; Carro et al., 2009) we noticed that shifts in the fermentation due to changes in the dietary forage:concentrate (**F:C**) ratio in Rusitec fermenters did not reproduce the changes usually found *in vivo*. Whereas the simulation of ruminal fermentation was quite satisfactory for high-forage (**HF**) diets, fermentation of high-concentrate (**HC**) diets resulted in unphysiological acetate:propionate ratios, with values higher than 4.0. In a recent study, Martínez et al. (2009) observed that increasing dilution rate from 3.78 to 5.42%/h and decreasing concentrate retention time from 48 to 24 h in Rusitec fermenters fed a HC diet decreased acetate:propionate ratio, and hypothesized that using higher dilution rates and shorter concentrate retention time than those usually utilized in Rusitec experiments might probably contribute to improve the simulation of the *in vivo* fermentation of HC diets. However, no studies have been conducted to test this

hypothesis, although experimental comparisons are necessary to validate the use of Rusitec as a reliable model for the study of ruminal fermentation of diets of different composition.

The aim of this study was to assess to what extent Rusitec fermenters can be used to characterize the effects of diet on patterns of ruminal fermentation observed in sheep. For that purpose, the effects of 4 diets differing in F:C ratio and type of forage on ruminal parameters and microbial growth were assessed in sheep, and the results were compared with those observed in Rusitec fermenters given the same diets.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Diets***

Four total mixed diets were formulated according to a  $2 \times 2$  factorial arrangement of treatments. The diets had F:C (DM basis) ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) with either alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage, and were designated as HFA, HFG, HCA and HCG, respectively. Ingredients and chemical composition of diets are shown in Table 4.5.1. The alfalfa hay was a second-cut harvested at 30% flowering and contained 91.3% DM, 2.67% N, 46.6% NDF, and 33.1% ADF (DM basis). The grass hay consisted primarily of perennial ryegrass (81%), red and white clover (11%), and other grasses (8%); was harvested at post-flowering stage; and contained 93.3% DM, 1.46% N, 56.9% NDF, and 28.6% ADF (DM basis). The concentrate contained 91.4% DM, 3.04% N, 33.5% NDF, and 12.5% ADF (DM basis).

### ***In vivo trial***

#### ***Animals and Experimental Procedure***

Four ruminally and duodenally cannulated Merino sheep ( $58.5 \pm 3.16$  kg BW) were used. Animals were cared and handled in accordance with the Spanish Animal Care Regulations, and the experimental protocols were approved by the León University Institutional Animal Care and Use Committee. Sheep were housed in individual pens and had continuous access to fresh water and vitamin/mineral block over the experimental period. Diets were offered to the animals twice daily (0800 and 2000 h) at a daily rate of 56 g of DM/kg of BW<sup>0.75</sup> to minimize feed selection. This level of intake was estimated to meet 1.2, 1.1, 1.4, and 1.3 times the energy maintenance

requirements of the experimental sheep for HFA, HFG, HCA, and HCG diets, respectively (NRC, 1985).

**Table 4.5.1.** Ingredients and chemical composition of the 4 experimental diets with F:C ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage.

Item	HFA	HFG	HCA	HCG
Ingredient, % of DM				
Alfalfa hay	70	-	30	-
Grass hay	-	70	-	30
Barley	6.4	6.4	15.2	15.2
Gluten feed	6.1	6.1	14.5	14.5
Wheat middlings	5.7	5.7	13.7	13.7
Soybean meal	4.1	4.1	9.7	9.7
Palmkern meal	3.8	3.8	9.0	9.0
Wheat	1.5	1.5	3.5	3.5
Corn	1.5	1.5	3.5	3.5
Vitamin-Mineral premix <sup>1</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0
Chemical composition				
DM, %	92.7	92.5	92.5	92.4
OM, % of DM	91.3	92.7	91.3	91.9
N, % of DM	2.69	1.94	2.83	2.56
<sup>15</sup> N (% atoms)	0.3670	0.3673	0.3674	0.3675
NDF, % of DM	42.6	49.9	37.4	40.1
ADF, % of DM	26.9	23.8	18.7	17.4
ME, <sup>2</sup> Mcal/kg of DM	2.12	2.00	2.45	2.39

<sup>1</sup> Vitamin-mineral premix contained per kilogram of DM: 11,250 IU of vitamin A; 2,250 IU of vitamin D<sub>3</sub>; 25 mg of Vitamin E; and 10 mg of CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O.

<sup>2</sup> Estimated according to the NRC (1985).

The experimental design was a 4 x 4 Latin square with 4 dietary treatments, 4 periods, and 4 sheep. Each 25-d experimental period consisted of 14 d of dietary adaptation and 11 d (d 15 to 25) for sample and data collection. The following schedule was employed: continuous infusions of flow and microbial markers from d 17 to 25, collection of duodenal digesta from d 22 to 24, and sampling of ruminal contents on d 25. During the sampling period, samples of feed offered, and refusals were collected daily and composited. Samples were dried at 55°C in an oven for 48 h and ground using a Culatti grinder (model DFH 48, Culatti, Zurich, Switzerland) with a 1-mm screen before chemical analyses.

On d 15 of each period, about 400 g of ruminal contents were taken through the cannula of each sheep and strained through 4 layers of cheesecloth. Five mL were

immediately frozen at -80°C for determination of carboxymethylcellulose, xylanase, and amylase activities. The remaining rumen content was used for bacteria cultivation, protozoa counting and isolation of ruminal bacteria for analyzing bacterial diversity, and the results are reported in a companion paper (Martínez et al., 2010).

On d 16, 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. Ruminal content was strained through 4 layers of cheesecloth and the pH of the fluid was immediately measured. Five 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 VFA analysis, 2 mL were added to 2 mL 0.5 M HCl for NH<sub>3</sub>-N determination, and 5 mL were frozen at -20°C for total lactate analyses.

Cr-mordanted fiber and Co-EDTA were used as solid and fluid phase markers, respectively, to assess the duodenal flow of digesta, and <sup>15</sup>N was used as a microbial marker. Cr-mordanted fiber was prepared from the total mixed diets given to the animals according to Udén et al. (1980). From d 17 to 25, 15 g of Cr-mordanted fiber were administered daily via the ruminal cannula into 4 equal portions at 0800, 1400, 2000 and 0200 h. Co-EDTA (Udén et al., 1980) and <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl (10% atom excess; Tracer SA, Madrid, Spain) were dissolved in distilled water and infused into the rumen (250 mL/d) at constant daily rate of 60 mg of Co and 30 mg of <sup>15</sup>N by means of a peristaltic pump (Gilson Minipuls Evolution, Gilson Inc., Middleton, WI).

On d 22, 23, and 24, duodenal digesta samples were collected at 6 h intervals. The sampling time was adjusted ahead 2 h daily in order to obtain a sample representative of daily duodenal flow. Samples were pooled by sheep and stored at -20°C. Duodenal samples were thawed at 4°C, homogenized, and half of each sample was centrifuged (1,000 x g, 5 min) to obtain particulate matter (Faichney, 1975). Both samples of whole duodenal digesta and particulate matter were freeze dried and analyzed for ash, non-ammonia N (NAN), NDF and <sup>15</sup>N.

On d 25, about 200 g of rumen contents were withdrawn from each sheep at 0, 4, and 8 h after the morning feeding. Rumen contents were squeezed through 4 layers of cheesecloth and the solid digesta was combined with an equal volume of saline solution (0.9% NaCl) at 38°C, mixed gently, and squeezed again to remove residual liquid-

associated bacteria (LAB). The filtrate obtained at each sampling time was kept at 4°C, pooled per sheep, and used to isolate LAB by differential centrifugation (Ranilla and Carro, 2003). The solid digesta was treated with saline solution (0.9% NaCl) containing 0.1% methylcellulose as described by Ranilla and Carro (2003) before isolation of solid-associated bacteria (SAB). Bacterial pellets (LAB and SAB) were lyophilized, ground to a fine powder with a mortar and pestle, and analyzed for N and <sup>15</sup>N enrichment.

### ***In vitro trial***

#### ***Apparatus, Experimental Procedure and Sampling***

Two identical 16-d incubation runs were carried out using 8 Rusitec fermenters (Czerkawski and Breckenridge, 1977). Fermenters had an effective volume of 600 mL, and the general incubation procedure was as described by Martínez et al. (2009). Treatments were assigned randomly so that in each run 2 fermenters received each of the diets. The inoculum was obtained from 8 ruminally fistulated sheep (59.2 ± 3.51 kg BW). Two sheep received each of the 4 experimental diets for 14 d before starting the *in vitro* trial. On the first day of each incubation run, each fermenter was inoculated with 250 mL of strained rumen fluid, 200 mL artificial saliva, and 80 g of solid rumen content supplied into a nylon bag. Ruminal contents from each sheep were collected immediately before the morning feeding, mixed by diet, strained through two layers of cheesecloth, and transferred to the corresponding fermenters within 30 minutes after collection.

The flow through fermenters was maintained by continuous infusion of artificial saliva (pH = 8.4; 9.8 g of NaHCO<sub>3</sub>, 3.72 g of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.47 g of NaCl, 0.57 g of KCl, 0.053 g of CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, and 0.128 g of MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O per L) at a rate of 740 mL/day (dilution rate of 5.14%/h). Each fermenter received daily 30 g of DM of the corresponding diet (Table 4.5.1.). Hay was chopped (approximately at 0.5-cm pieces), and the concentrate was ground through a 3-mm sieve. Forage and concentrate were fed once daily (0800 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., 1998; Carro et al., 2000; Valdés et al., 2000). Each fermenter was flushed daily with 2 L of

CO<sub>2</sub> both before and after feeding, in order to remove gases produced during the fermentation and the air introduced in the fermenter during feeding, respectively.

On d 10, a dose of 3.5 mg of <sup>15</sup>N (98% enriched <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl; Tracer SA, Madrid, Spain) was added into each fermenter to instantaneously label the ammonia-N pool. From d 10 to 15, a solution of <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl was added to the artificial saliva at a rate of 4.0 mg of <sup>15</sup>N per g of dietary N. On d 10, 11, 12 and 13, pH of each fermenter's fluid was determined immediately before feeding and the following samples were collected. Liquid effluent was collected daily in flasks containing a solution of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20%; v:v) to maintain pH below 2. One mL of effluent was added to 1 mL of deproteinizing solution (10% of metaphosphoric acid and 0.06% crotonic acid; wt/vol) for VFA determination, and 5 mL of effluent were stored at -20°C for ammonia-N and total lactate determinations. Two nylon bags (one with forage and one with concentrate) from each fermenter were collected daily, washed twice with 40 mL of fermenter liquid and then washed in the cold rinse cycle (20 min) of a washing machine. The DM apparent disappearance was calculated from loss in weight after oven drying at 60°C for 48 h, and the residues were analyzed for NDF.

On days 14 and 15 a water solution saturated with HgCl<sub>2</sub> (5 mL) was added (replacing the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution which could cause bacterial lysis) to the overflow containers, which were held in an icewater bath to impede microbial growth. Approximately 500 mL of effluent was used for isolation of LAB. The contents of nylon bags removed on d 15 and 16 were used to determine the growth of SAB. About 20% of solid content from each nylon bag was frozen and lyophilized for determination of DM, NAN and <sup>15</sup>N enrichment. The SAB pellets were isolated after treating the remaining solid content with a saline solution of 0.1% methylcellulose as described above.

On d 15, about 3 mL of fermenter fluid were taken at 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h after feeding, the pH was immediately measured and 1 mL of fluid was added to 1 mL of deproteinizing solution for VFA analysis. In addition, 3 mL of fermenters fluid were taken at 0 h and immediately frozen at -80°C for determination of carboxymethylcellulase, xylanase and amylase activities. Fermenters fluid was also sampled at 0 h for bacteria cultivation, protozoa counting and isolation of ruminal

bacteria for analyzing bacterial diversity, and the results are reported in a companion paper (Martinez et al., 2010).

### ***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 and ADF analyses were carried out according to Van Soest et al. (1991) using an ANKOM<sup>220</sup> Fibre Analyzer unit (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA). Sodium sulphite and heat-stable amylase were used in analysis of NDF and ADF, and they were expressed inclusive of residual ash.

Analyses of VFA, ammonia-N and lactate have been described by Carro and Miller (1999). Marker (Co, Cr) concentrations in both whole and solid duodenal samples were analyzed by atomic emission spectrophotometry (AES-ICP, Perkin Elmer 2000 DV, Uberlingen, Germany) after wet digestion according to Williams et al. (1962). Wavelengths for Cr and Co were 268 and 228 nm, respectively, and values were corrected for concentrations of Cr and Co determined in each sheep before markers infusion. Procedures for NAN and <sup>15</sup>N analysis in feeds, digesta, and bacterial isolates have been reported by Carro and Miller (1999), and analyses of <sup>15</sup>N enrichment were performed by isotope ratio mass spectrometry (VG PRISM II, Middlewich, UK) connected in series to a Dumas-style N analyzer (model 1108, Carlo Erba Instruments, Milan, Italy).

For determination of enzymatic activities in ruminal fluid samples, samples were defrosted, and cells were lysed using a Mini-Beadbeater (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) to release intracellular enzymes. The treatment consisted of three 60-s pulses at 4°C using 0.1 mm glass beads. Unbroken cell material was removed by centrifugation (10.000 x g, 10 min, 4°C), and the supernatant (200 µL) was used for analyses. Carboxymethylcellulase, xylanase and amylase activities were determined following the procedures described by Giraldo et al. (2008) using as substrates carboxymethylcellulose, oat spelt xylan and soluble starch, respectively. Enzymatic activities were expressed as nmol of glucose or xylose released from the corresponding substrates by 1 mL of ruminal fluid in 1 min at 39°C and pH = 6.5.



### ***Calculations and Statistical Analyses***

Duodenal flow in sheep was calculated from the concentrations of Cr and Co in duodenal digesta phases using the dual-phase 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). The flow of microbial N at the duodenum was calculated using  $^{15}\text{N}$  as a microbial marker and the mean value between  $^{15}\text{N}$  enrichment in LAB and SAB as  $^{15}\text{N}$  enrichment in reference bacteria, as follows:

$$\text{microbial NAN flow (g/d)} = \text{DM digesta flow (g/d)} \times \text{NAN in digesta (g/g DM)} \times (\text{^{15}N atom\% excess in digesta} / \text{^{15}N atom\% excess in bacterial reference}).$$

In fermenters, the proportion of digesta NAN (liquid or solid) of microbial origin was estimated by dividing the  $^{15}\text{N}$  enrichment (atoms % in excess) of the NAN portion of digesta by the enrichment of the corresponding microbial pellets (LAB or SAB, respectively). Daily microbial N production of LAB and SAB was estimated by multiplying total NAN production in the corresponding digesta (liquid or solid) by the proportion attributed to the microbes. Total daily microbial production was calculated as the sum of the flows of LAB and SAB. The natural  $^{15}\text{N}$  content in diets before  $^{15}\text{N}$  infusion was used for background correction *in vivo* and *in vitro*.

The efficiency of microbial growth was expressed as mg microbial N per g OM apparently fermented. The amount of OM apparently fermented in the rumen of sheep was calculated as the difference between the OM intake and OM duodenal flow. The amount of OM apparently fermented in the fermenters was estimated from VFA production using the equation proposed by Blanchart et al. (1989).

*In vivo* and *in vitro* data were analyzed separately to assess the effects of dietary treatments on each fermentation system. Data from *in vivo* trial were analyzed according to a 4 x 4 Latin square model using the MIXED procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) according to the following model:

$$Y_{ijkl} = \mu + c_i + P_j + FC_k + F_l + FCF_{kl} + e_{ijkl},$$

where  $Y_{ijkl}$  = the dependent variable,  $\mu$  = the overall mean;  $c$  = the random effect of sheep ( $i = 1$  to 4);  $P$  = the fixed effect of period ( $j = 1$  to 4);  $FC$  = the fixed effect of F:C ( $k = 1$  to 2);  $F$  = the fixed effect of FOR ( $l = 1$  to 2);  $FCF$  = the interaction of F:C and FOR; and  $e$  = the residual error. In the analysis of *in vitro* data the random effect of fermenter was  $i = 1$  to 8, and the fixed effect of period  $j = 1$  to 2. When a significant effect of treatment ( $P \leq 0.05$ ) was detected, differences among means were tested using the Tukey's multiple comparison test.

## RESULTS AND DISCUSSION

As pointed out by Czerkawski and Breckenridge (1977), it is difficult to judge how closely an *in vitro* technique simulates the *in vivo* rumen and what the most appropriate measurements are. Clearly, no direct comparisons can be made when the outputs are expressed as daily amounts of products, because absolute amounts of input and outflow from animals and fermenters usually differ in magnitude; therefore, only data with similar units, i.e. proportions and concentrations, should be statistically compared (Mansfield et al., 1995). Fermenters are frequently used to analyze differences between different dietary treatments, and from a practical point of view it would be interesting to assess if they can detect the same differences observed *in vivo*. Therefore, the main objective of the present study was to assess the ability of Rusitec fermenters to detect the same changes in ruminal fermentation and microbial growth promoted by feeding diets of contrasting quality to sheep. In order to achieve this objective, the effects of F:C ratio and type of forage on ruminal parameters and microbial growth were analyzed independently within each fermentation system.

Rusitec fermenters were run under the conditions that are usually utilized in our laboratory. Although ruminal fluid from a single animal has been used to inoculate fermenters in some studies (Ziemer et al., 2000; Hess et al., 2003), in our laboratory at least 2 different animals per treatment are regularly used as donors to ensure a representative microbial population. Recently, Mutzel et al. (2009) observed that fermenters inoculated with ruminal fluid from 2 different cows showed a completely different evolution of protozoa population over the incubation period: whereas protozoa from one cow were broadly maintained in the fermenters, protozoa from the other cow decreased close to the detection limit within 12 days. This result illustrates the importance of using mixed inocula from more than one single animal.

The approach followed in this study differs from that used in other comparison *in vivo* vs. *in vitro*. Mansfield et al. (1995), Ziemer et al. (2000) and Mutzel et al. (2009) compared the fermentation variables determined in fermenters with those measured in the donor animals. Because our aim was to assess to what extent Rusitec fermenters could detect differences between diets similar to those found in sheep, the *in vivo* trial was conducted first with 4 sheep, and for the *in vitro* trial 4 additional sheep were used as ruminal fluid donors. This was done to have 2 donor sheep per dietary treatment. Although 4 sheep were used in the *in vivo* trial, we decided to utilize 8 fermenters in the *in vitro* trial because in previous experiments we have never detected a significant effect of fermenter on fermentation parameters (Gómez et al., 2005; Carro et al., 2009; Martínez et al. (2009) and considered that a Latin square design was not necessary.

The effects of F:C ratio and type of forage on ruminal fermentation in both fermentation systems are shown in Tables 4.5.2., 4.5.3., 4.5.4. and 4.5.5. In general, *P*-values of ANOVA were greater *in vivo* than in Rusitec fermenters, which was due to the greater variability found for most measured variables in sheep (values ranging from 2.1 to 25%) compared with fermenters (values from 1.2 to 17%). Ruminal pH before feeding and mean values of pH over the 12 h postfeeding were greater for HF than for HC diets in sheep and fermenters ( $P < 0.001$  to 0.03; Table 4.5.2.). Whereas the type of forage in the diet did not affect pH values measured immediately before feeding ( $P = 0.95$ ) or over the 12 h post-feeding period in sheep ( $P = 0.56$ ), both variables were greater in A-fed fermenters compared with those fed G diets ( $P = 0.004$  and 0.005, respectively). Alfalfa hay has been shown to have a greater buffer capacity than grass hay (Fadel, 1992), and this may explain the greater pH values observed in A-fed fermenters. In sheep, the type of forage in the diet influences rumination activity, digestion rate and saliva production, factors which can further affect ruminal pH and cannot be simulated in fermenters.

**Table 4.5.2.** Ruminal pH, NH<sub>3</sub>-N and lactate concentrations, and apparent diet digestibility in the rumen of sheep and Rusitec fermenters receiving diets differing in forage:concentrate ratio (F:C) and type of forage (FOR).

Item	FS	Diet <sup>1</sup>				SEM	Significance of effects ( <i>P</i> = )		
		HFA	HFG	HCA	HCG		F:C	FOR	F:C x FOR
pH 0 h	Rumen	6.73 <sup>c</sup>	6.69 <sup>ab</sup>	6.33 <sup>b</sup>	6.38 <sup>a</sup>	0.101	< 0.01	0.95	0.66
	Fermenters	6.90 <sup>b</sup>	6.57 <sup>a</sup>	6.48 <sup>b</sup>	6.41 <sup>ab</sup>	0.009	< 0.001	0.004	< 0.001
pH 0-12 h	Rumen	6.49 <sup>b</sup>	6.45 <sup>ab</sup>	6.22 <sup>ab</sup>	6.15 <sup>a</sup>	0.097	0.03	0.56	0.88
	Fermenters	6.67 <sup>c</sup>	6.32 <sup>b</sup>	6.17 <sup>ab</sup>	6.04 <sup>a</sup>	0.050	< 0.001	0.005	0.08
NH <sub>3</sub> -N, mg/L <sup>2</sup>	Rumen	199 <sup>b</sup>	85.5 <sup>a</sup>	192 <sup>b</sup>	118 <sup>a</sup>	10.8	0.29	< 0.001	0.12
	Fermenters	393 <sup>d</sup>	83.5 <sup>a</sup>	248 <sup>c</sup>	140 <sup>b</sup>	8.1	0.003	< 0.001	< 0.001
Lactate, mg/L <sup>2</sup>	Rumen	36.8 <sup>ab</sup>	32.1 <sup>a</sup>	42.0 <sup>b</sup>	42.5 <sup>b</sup>	2.13	0.01	0.36	0.27
	Fermenters	13.3	12.8	13.0	12.0	0.67	0.47	0.31	0.70
Apparent ruminal digestibility, %									
DM	Rumen	50.9 <sup>c</sup>	53.3 <sup>d</sup>	41.9 <sup>a</sup>	44.1 <sup>b</sup>	0.62	< 0.001	0.01	0.88
	Fermenters	71.3 <sup>b</sup>	67.4 <sup>a</sup>	70.7 <sup>b</sup>	68.2 <sup>a</sup>	0.54	0.82	0.002	0.26
NDF	Rumen	62.9 <sup>c</sup>	64.9 <sup>c</sup>	50.6 <sup>a</sup>	58.4 <sup>b</sup>	1.45	< 0.001	0.03	0.05
	Fermenters	36.0 <sup>ab</sup>	44.8 <sup>c</sup>	34.7 <sup>a</sup>	38.0 <sup>b</sup>	0.88	0.006	0.001	0.03

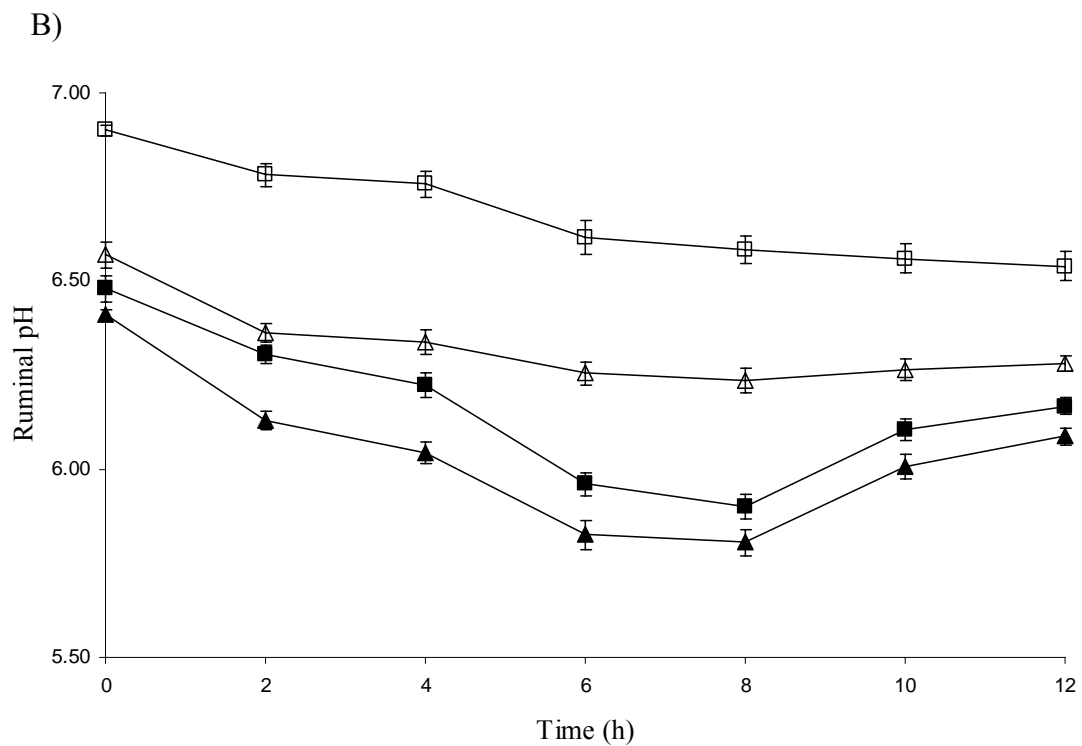
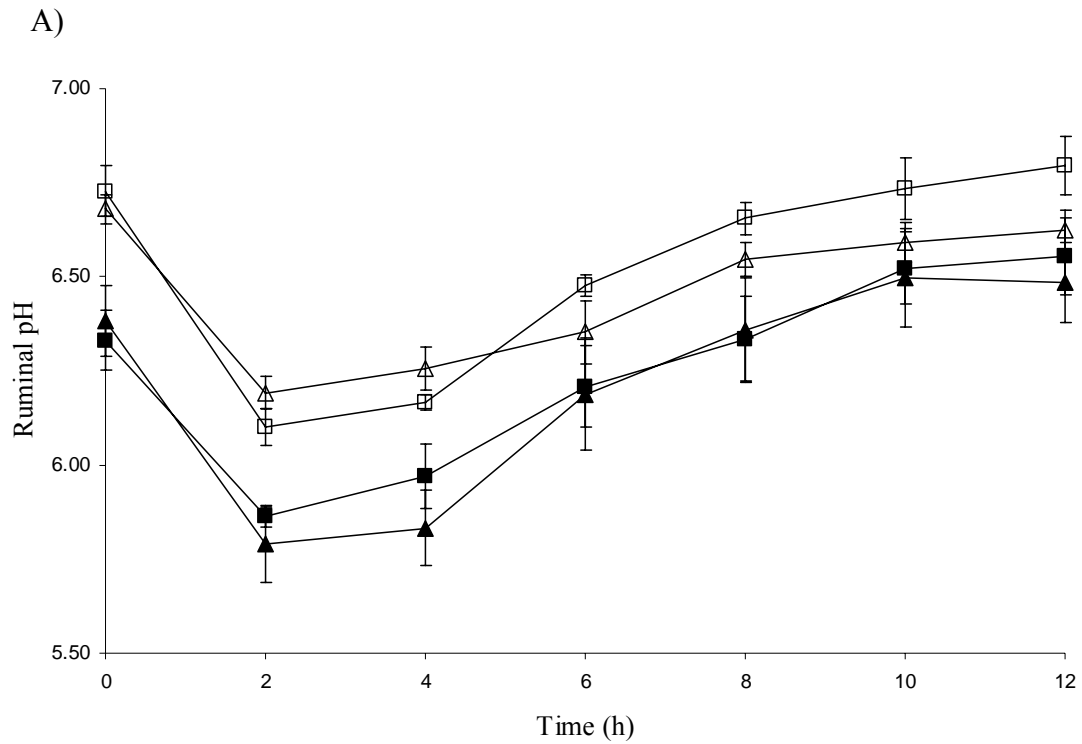
<sup>a, b, c, d</sup> Within each row, means with different superscripts differ (*P* < 0.05; Tukey's test).

<sup>1</sup> HFA: 70:30 alfalfa hay:concentrate; HFG: 70:30 grass hay:concentrate; HCA: 30:70 alfalfa hay:concentrate; HCG: 30:70 grass hay:concentrate. DM basis.

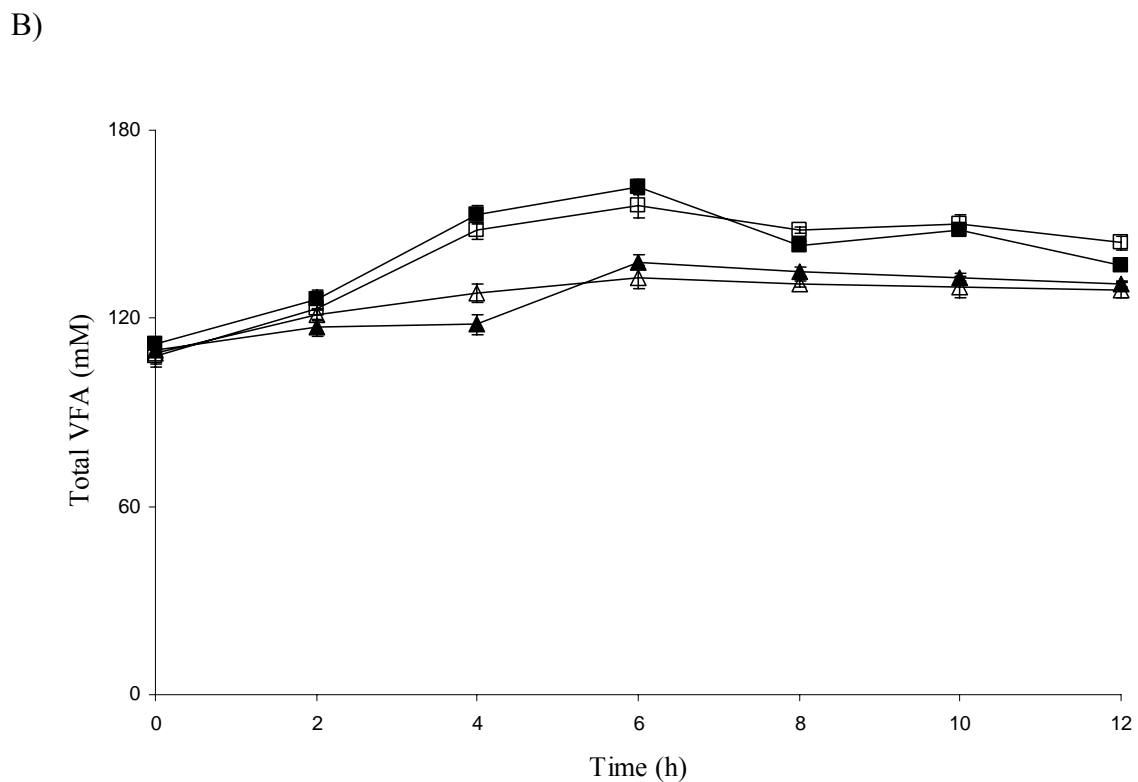
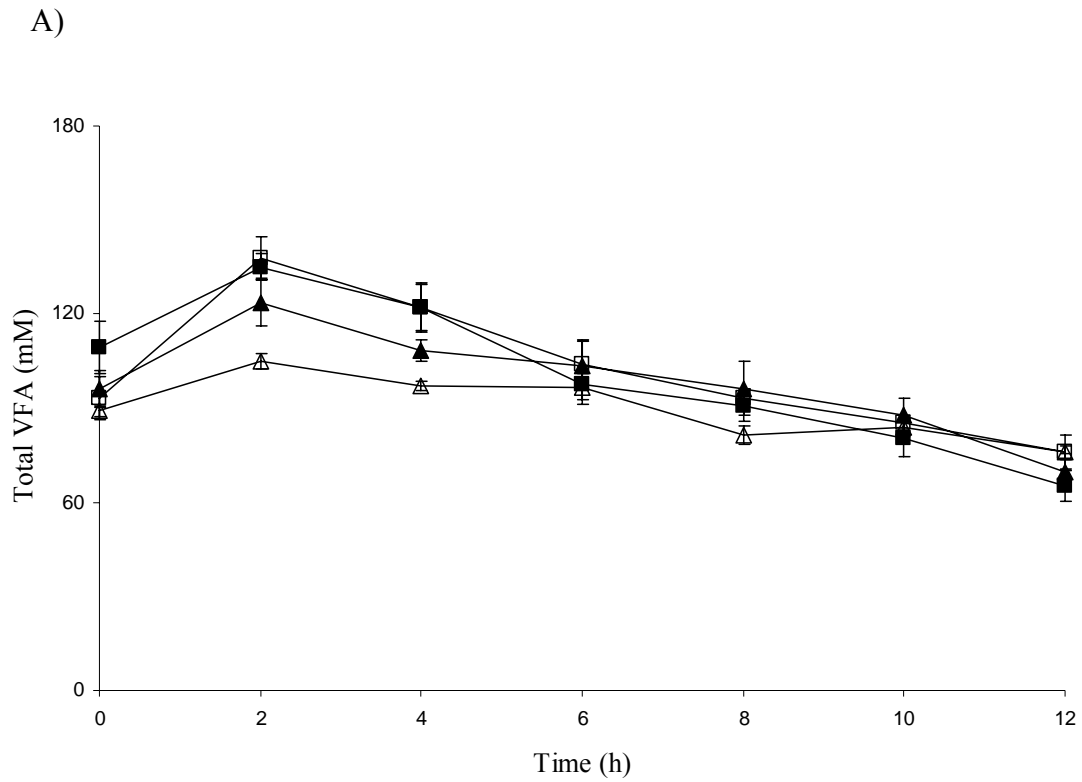
<sup>2</sup> Values for sheep rumen are means across sampling times of 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 and 22 h after a.m. feeding.

As shown in Figure 4.5.1., the post-feeding evolution of pH in fermenters differed from that observed in sheep. Ruminant pH in sheep decreased markedly 2 h post-feeding for all diets and gradually increased afterwards, whereas in Rusitec fermenters pH decreased progressively after feeding and reached minimum values at 6-8 h after feed supply. In both systems, the decrease in pH was more pronounced for HC than for HF diets; whereas ruminant pH did not drop below 6.0 for HF diets either in sheep or in fermenters, minimum pH values of 5.8 were observed in both systems for HC diets (see Figure 4.5.1.).

The post-feeding evolution of pH would indicate that feed fermentation was slower in fermenters compared with sheep, and this is also indicated by the evolution of total VFA concentrations in ruminal fluid (Figure 4.5.2.); total VFA concentrations increased shortly after feeding in sheep, reaching maximum values 2 h after feed intake, whereas in fermenters VFA concentrations increased gradually to maximum values at 6 h after feed supply. These differences between sheep and fermenters might be related to the way of operation of Rusitec fermenters. Each day, 2 bags containing undigested feed are removed, drained, washed twice with fermenters fluid, and washes are returned to fermenter. When the undigested feed enclosed in the nylon bags is washed, a proportion of microbial matter can be removed (Czerkawski and Breckenridge, 1979), but considerable microbial mass still remain attached to feed particles and is removed from the fermenter. In our study, the proportion of microbial N in the undigested feed residues was 62, 73, 54 and 55% of the total daily microbial N output for diets HFA, HFG, HCA and HCG, respectively (values not shown). In the ruminant, feed entering the rumen is readily (within 5-15 min of feed ingestion) colonized by the microorganisms resident in ruminal fluid, and plateaus or reverses either as microbial density on the particle exceeds attachment sites or potentially digestible substrates are exhausted (Cheng and McAllister, 1997). In Rusitec system, the microbes enclosed in the old nylon bags remaining from the previous day in the fermenters and those in the liquid phase have to reach the new feed supplied every day and colonize the feed particles, and this could explain the delayed increase in VFA concentrations observed in fermenters compared with sheep. In addition, it has to be taken into account that Rusitec fermenters are opened to introduce new nylon bags with feed, and this operation exposes the ruminal microorganisms to oxygen, being a substantial stress situation for the strict anaerobic ones (Gizzi et al., 1998).



**Figure 4.5.1.** Ruminal pH in sheep (A) and fermenters (B) fed diets with F:C ratios of 70:30 (open symbols) or 30:70 (shaded symbols) and alfalfa hay (□, ■) or grass hay (△, ▲) as forage. Sheep were fed at 0 and 12 h and fermenters once daily at 0 h. Error bars are SEM.



**Figure 4.5.2.** Total VFA concentrations in sheep (A) and fermenters (B) fed diets with F:C ratios of 70:30 (open symbols) or 30:70 (shaded symbols) and alfalfa hay (□, ■) or grass hay (△, ▲) as forage. Sheep were fed at 0 and 12 h and fermenters once daily at 0 h. Error bars are SEM.

The F:C ratio in the diet did not ( $P = 0.29$ ) affect  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentrations in sheep, but significant effects were found in Rusitec, HC-fed fermenters showing lower ( $P = 0.003$ ; Table 4.5.2.) values than HF-fed ones. The lower ( $P < 0.001$ )  $\text{NH}_3\text{-N}$  levels observed in both systems for G diets may have been due to the lower N input (see Table 4.5.1.), but might also suggest lower protein degradation compared with sheep and fermenters receiving A diets. Ruminal lactate concentrations were greater ( $P = 0.01$ ) in sheep fed HC compared with those fed HF diets, but no differences ( $P = 0.47$ ) due to F:C ratio were observed in fermenters. Lactate concentrations in sheep rumen were lower than those reported by others in sheep in latent acidosis fed HC diets (Mackie et al., 1978; Brossard et al., 2003). It is probable that the moderate level of feeding and the fibrous nature of the concentrate used in the present experiment (containing 33.5% NDF and only 32% cereal grains; Table 4.5.1.) prevented the rapid fall in pH which is characteristic of animals given larger amounts of cereal grains. In addition, the fact that animals received mixed diets could have reduced the negative effects on pH usually observed by the fermentation of HC diets, because mixed diets tend to minimize the daily variations in rumen pH (Carro et al., 2000). The type of FOR did not affect lactate concentrations either in sheep ( $P = 0.36$ ) or in fermenters ( $P = 0.31$ ). Lactate concentrations were 3.0 times lower in fermenters than in sheep rumen (mean value for all diets), which may suggest either lower lactate production or greater lactate utilization in the fermenters compared with sheep. The low lactate concentrations observed in Rusitec are in accordance with the values previously reported by others (Czerkawski and Breckenridge, 1979; Olivera et al., 1997). Olivera et al. (1997) reported that an efficient lactate-fermenting population was achieved rapidly in Rusitec fermenters, and hypothesized that the low levels of lactate, associated with the observed increase in butyrate and caproate in their study, may be explained by the presence of *Megasphaera elsdenii*, the major ruminal lactolytic bacteria. In our study, molar proportions of butyrate and caproate were 1.5 and 4.4 times greater, respectively, than in sheep (mean values for all diets; Table 4.5.3.), which is in agreement with the observations of Olivera et al. (1997).

As shown in Table 4.5.2., sheep fed HF diets showed greater ( $P < 0.001$ ) ruminal digestibility of DM than those fed HC diets, but no differences ( $P = 0.82$ ) were observed in fermenters. In contrast, both systems detected similar differences in ruminal digestibility of NDF, values being greater for HF compared with HC diets ( $P < 0.001$



and 0.006 for sheep and fermenters, respectively). The lower ruminal NDF digestibility observed for HC diets could be due to the lower pH values compared with those found in sheep and fermenters fed HF diets (Table 4.5.2.). Although pH did not drop below 6.0 at any sampling time for HF diets in both systems, values for HC diets were below 6.0 at 2 and 4 h after feeding in sheep, and at 6 and 8 h after feeding in fermenters (see Figure 4.5.1.). Cellulolytic bacteria are known to be very pH sensitive, and growth and activity start to decline significantly at pH values below 6.0 (Russell, 1996). The NDF digestibility was 1.1 times greater for G than for A diets both *in vivo* ( $P = 0.03$ ) and *in vitro* ( $P = 0.001$ ), which is consistent with the idea that grass fiber is more digestible than that of legumes. In agreement with the results of Mansfield et al. (1995) comparing ruminal digestibility of 4 diets in cows with that in dual-flow continuous-culture fermenters, values of NDF digestibility were about 1.5 times greater in sheep compared with fermenters.

The supplementation of forage diets with readily fermentable carbohydrates usually result in increased total ruminal VFA concentrations (Pérez et al., 1996), but a lack of response to different F:C ratios in the diet has also been observed (Carro et al., 2000). In our study, total VFA concentrations were not affected by F:C ratio either in sheep ( $P = 0.21$ ) or in fermenters ( $P = 0.13$ ). The lack of effect of F:C ratio on VFA concentrations in fermenters is in accordance with the absence of differences among diets in DM digestibility, but in sheep lower DM digestibilities were observed for HC compared with HF diets. Whereas there is no absorption in fermenters, and thus VFA concentrations should be directly related to the amount of DM digested (providing that dilution rate is similar in all fermenters), VFA concentrations do not necessarily reflect VFA production in sheep due to absorption through the rumen wall and passage with the fluid to the omasum. Total VFA concentrations were about 1.1 times greater for A than for G diets both in sheep ( $P = 0.006$ ) and fermenters ( $P = 0.002$ ).

The effect of F:C ratio on the VFA profile is not clear in the literature. In some studies (Mackie et al., 1978; Carro et al., 2000) decreasing F:C ratio increased the proportions of propionate and butyrate at the expense of acetate, but in others it increased butyrate at the expense of acetate and propionate (Brossard et al., 2003). In our study, decreasing F:C ratio resulted in decreased acetate ( $P = 0.009$  and  $< 0.001$  for sheep and fermenters, respectively) and butyrate ( $P = 0.03$  and  $< 0.001$ ) proportions,

**Table 4.5.3.** Ruminal VFA concentrations, molar proportions of VFA, and acetate/propionate ratio in the rumen of sheep and Rusitec fermenters receiving diets differing in forage:concentrate ratio (F:C) and type of forage (FOR).

Item	FS	Diet <sup>1</sup>				SEM	Significance of effects ( <i>P</i> = )		
		HFA	HFG	HCA	HCG		F:C	FOR	F:C x FOR
Total VFA, mM <sup>2</sup>	Rumen	110	94.4	110	102	2.9	0.21	0.006	0.25
	Fermenters	125	116	129	117	2.5	0.13	0.002	0.14
Molar proportion (mol/100 mol) of:									
Acetate	Rumen	66.6 <sup>bc</sup>	67.2 <sup>c</sup>	63.4 <sup>a</sup>	63.7 <sup>ab</sup>	0.88	0.009	0.65	0.89
	Fermenters	51.8 <sup>b</sup>	52.6 <sup>b</sup>	46.2 <sup>a</sup>	47.3 <sup>a</sup>	0.38	< 0.001	0.12	0.92
Propionate	Rumen	17.9	19.3	18.0	19.8	0.63	0.62	0.06	0.76
	Fermenters	22.1 <sup>b</sup>	20.0 <sup>a</sup>	22.2 <sup>b</sup>	20.5 <sup>a</sup>	0.27	0.28	0.007	0.54
Butyrate	Rumen	11.1 <sup>ab</sup>	10.8 <sup>a</sup>	14.2 <sup>b</sup>	13.1 <sup>ab</sup>	0.95	0.03	< 0.001	0.68
	Fermenters	15.3 <sup>a</sup>	17.8 <sup>b</sup>	19.7 <sup>c</sup>	19.4 <sup>c</sup>	0.30	< 0.001	0.02	0.03
Isobutyrate	Rumen	1.16 <sup>b</sup>	0.75 <sup>a</sup>	1.11 <sup>b</sup>	0.69 <sup>a</sup>	0.042	0.24	< 0.001	0.86
	Fermenters	1.12 <sup>c</sup>	0.63 <sup>a</sup>	0.83 <sup>b</sup>	0.64 <sup>a</sup>	0.010	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Isovalerate	Rumen	1.18 <sup>b</sup>	0.65 <sup>a</sup>	1.16 <sup>b</sup>	0.70 <sup>a</sup>	0.060	0.81	< 0.001	0.58
	Fermenters	2.56 <sup>a</sup>	3.63 <sup>b</sup>	2.70 <sup>a</sup>	3.40 <sup>b</sup>	0.143	0.23	< 0.001	0.71
Valerate	Rumen	1.90 <sup>c</sup>	1.13 <sup>a</sup>	1.73 <sup>bc</sup>	1.59 <sup>b</sup>	0.083	0.16	0.002	0.009
	Fermenters	5.89 <sup>b</sup>	4.65 <sup>a</sup>	6.83 <sup>c</sup>	7.08 <sup>c</sup>	0.082	< 0.001	0.002	< 0.001
Caproate	Rumen	0.22 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.37 <sup>b</sup>	0.38 <sup>b</sup>	0.031	0.004	0.56	0.73
	Fermenters	1.30 <sup>b</sup>	0.77 <sup>a</sup>	1.57 <sup>b</sup>	1.66 <sup>b</sup>	0.098	0.002	0.11	0.14
Acetate/propionate, mol/mol	Rumen	3.72 <sup>b</sup>	3.48 <sup>ab</sup>	3.53 <sup>ab</sup>	3.22 <sup>a</sup>	0.122	0.09	0.08	0.98
	Fermenters	2.34 <sup>b</sup>	2.62 <sup>c</sup>	2.08 <sup>a</sup>	2.31 <sup>b</sup>	0.044	< 0.001	0.006	0.25

<sup>a, b, c</sup> Within each row, means with different superscripts differ (*P* < 0.05; Tukey's test).

<sup>1</sup> HFA: 70:30 alfalfa hay:concentrate; HFG: 70:30 grass hay:concentrate; HCA: 30:70 alfalfa hay:concentrate; HCG: 30:70 grass hay:concentrate. DM basis.

<sup>2</sup> Values for sheep rumen are means across sampling times of 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 and 22 h after a.m. feeding.

increased proportions of caproate ( $P = 0.004$  and  $0.002$ ), and unchanged propionate ( $P = 0.62$  and  $0.28$ ) and isovalerate ( $P = 0.81$  and  $0.23$ ) proportions (Table 4.5.3.). In contrast, differences between systems in detecting the effects of F:C ratio were detected in the proportions of isobutyrate and valerate; HC-fermenters showed lower isobutyrate ( $P < 0.001$ ) and greater ( $P < 0.001$ ) valerate proportions compared with HF-fermenters, whereas no differences between sheep fed HC and HF were observed ( $P = 0.24$  and  $0.16$ , respectively). In agreement with previous studies (Mackie et al., 1978; Carro et al., 2000) decreasing F:C ratio in the diet tended ( $P = 0.09$ ) to decrease acetate:propionate ratio in sheep and decreased it in fermenters ( $P < 0.001$ ).

Although the results indicate that Rusitec fermenters detected differences between HF and HC diets in the concentrations of the main VFA similar to those observed in sheep, values of VFA proportions differed between systems. Acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, isovalerate, valerate and caproate proportions in fermenters were 0.79, 1.14, 1.51, 0.90, 3.88, 3.61 and 4.49 times of those observed in sheep for HF diets, respectively, and 0.74, 1.13, 1.43, 0.84, 3.59, 4.20 and 4.31 times for HC diets. The lower acetate and greater butyrate and minor VFA proportions found in fermenters compared with sheep confirm previous observations made in our laboratory with Rusitec fermenters (Carro et al., 2009). Results obtained with dual-flow or single-flow continuous-culture fermenters are contradictory. Mansfield et al. (1995) found greater butyrate, valerate, and branched-chain VFA proportions in dual-flow continuous culture fermenters than in the rumen of cows fed 4 diets differing in their content in non-fibrous carbohydrates and ruminally degradable protein, but observed no significant differences in acetate proportions. Ziemer et al. (2000) observed lower proportions of acetate, isobutyrate and isovalerate and greater valerate proportions in dual-flow continuous culture fermenters than in the rumen of the donor cow. On the contrary, Mutzel et al. (2009) found no differences in the proportions of VFA in single-flow continuous-cultures fermenters compared with those found in the rumen of cows receiving a high-forage diet. The different operating conditions in the fermenters and diets used in the studies cited previously might contribute to explain these contradictory results. In our study, there were positive relationships between the VFA proportions found in sheep and those in fermenters ( $n = 4$ ) for acetate ( $r = 0.996$ ;  $P = 0.004$ ) and propionate ( $r = 0.917$ ;  $P = 0.08$ ), but no relationship ( $P = 0.31$ ) was observed for butyrate.

Both systems detected similar differences due to the type of FOR, with the exception of butyrate proportion (Table 4.5.3.). The type of FOR did not influence the proportion of acetate ( $P = 0.65$  and  $0.12$  in sheep and fermenters, respectively) and caproate ( $P = 0.56$  and  $0.11$ ), but proportions of propionate, isobutyrate, isovalerate and valerate were greater ( $P < 0.001$  to  $0.05$ ) for A than for G diets. The greater concentrations of isobutyrate, isovalerate, and valerate observed with A diets might be due to a more extensive protein degradation compared with G diets, because these VFA are produced by the fermentation of branched-chain AA.

In contrast with other studies in which fibrolytic activities in the rumen were either not affected or decreased by increasing the proportion of concentrate in the diet (Hristov et al., 2001; Martin et al., 2001), carboxymethylcellulase and xylanase activities in sheep ruminal fluid were greater ( $P < 0.001$ ) for HC compared with HF diets (Table 4.5.4.). These controversial results could be partly explained by the high ruminal pH values, which did not drop at any sampling time below 5.8 in sheep fed HC diets (see Figure 4.5.1.), but it reached lower values in the previously cited studies. In contrast, no differences between HF and HC diets were observed in Rusitec fermenters ( $P = 0.27$  and  $0.69$  for carboxymethylcellulase and xylanase, respectively), despite of the considerably lower inter-individual variability observed for enzymatic activities in fermenters compared with sheep. This is in contrast to the greater NDF digestibility observed for HF diets (see Table 4.5.2.), but it should be taken into account that fibrolytic activity in the liquid phase of the rumen is very low compared with the activities in the solid digesta (Cheng and McAllister, 1997), and differences between phases may be more pronounced in the Rusitec system due to its greater compartmentalization compared with *in vivo*.

In agreement with others (Martin and Michalet-Doreau, 1995; Hristov et al., 2001), increasing F:C ratio resulted in increased ( $P < 0.001$ ) amylase activities in ruminal fluid in sheep and fermenters. There were no effects of type of FOR on any enzymatic activity, with the exception of carboxymethylcellulase activity, which was greater ( $P = 0.009$ ) in sheep fed A diets than in those fed G diets. Mutzel et al. (2009) reported that cellulase activity remained similar in single-flow continuous culture fermenters to the values observed in the rumen of donor cows, but xylanase activity increased 2.8 times over the incubation period in fermenters. All the enzymatic

**Table 4.5.4.** Enzymatic activities in ruminal fluid from sheep and Rusitec fermenters receiving diets differing in forage:concentrate ratio (F:C) and type of forage (FOR).

Item <sup>2</sup>	FS	Diet <sup>1</sup>				SEM	Significance of effects ( <i>P</i> = )		
		HFA	HFG	HCA	HCG		F:C	FOR	F:C x FOR
Carboxymethylcellulase	Rumen	0.94 <sup>ab</sup>	0.85 <sup>a</sup>	1.46 <sup>c</sup>	1.09 <sup>b</sup>	0.061	< 0.001	0.009	0.07
	Fermenters	0.15	0.15	0.15	0.16	0.006	0.27	0.77	0.75
Xylanase	Rumen	8.10 <sup>b</sup>	7.42 <sup>b</sup>	1.07 <sup>a</sup>	1.09 <sup>a</sup>	0.640	0.003	0.68	0.55
	Fermenters	1.09	1.11	1.16	1.09	0.054	0.69	0.62	0.40
Amylase	Rumen	1.72 <sup>a</sup>	1.55 <sup>a</sup>	4.99 <sup>b</sup>	5.54 <sup>b</sup>	0.337	< 0.001	0.58	0.32
	Fermenters	0.24 <sup>a</sup>	0.26 <sup>a</sup>	3.52 <sup>b</sup>	3.61 <sup>b</sup>	0.013	< 0.001	0.45	0.67

<sup>a, b, c</sup> Within each row, means with different superscripts differ (*P* < 0.05; Tukey's test).

<sup>1</sup> HFA: 70:30 alfalfa hay:concentrate; HFG: 70:30 grass hay:concentrate; HCA: 30:70 alfalfa hay:concentrate; HCG: 30:70 grass hay:concentrate. DM basis.

<sup>2</sup> Carboxymethylcellulase and amylase activities are expressed as  $\mu\text{mol}$  of glucose released from carboxymethylcellulose and soluble starch, respectively, by 1 mL of ruminal fluid in 1 min at 39°C and pH=6.5. Xylanase activity is expressed as  $\mu\text{mol}$  of xylose liberated from oat spelt xylan by 1 mL of ruminal fluid in 1 min at 39°C and pH=6.5.

activities determined in our study were numerically lower in fermenters than *in vivo*, but the magnitude of the differences was influenced by the diet. Values of amylase activity in sheep were 6.5 times greater than in fermenters for HF diets, but only 1.5 times greater for HC diets. Xylanase activity was similar in sheep and fermenters for HC diets, but sheep showed values 7.1 greater than fermenters for HF diets.

One of the key measurements of an *in vitro* system is microbial growth, due to the difficulties in determining microbial protein synthesis *in vivo* associated with the use of cannulated animals and digesta flow markers. However, a microbial marker is still necessary to differentiate microbial N from undegraded feed N. In this study,  $^{15}\text{N}$  was chosen as a microbial marker because previous work has shown that it is more accurate and precise than other markers (Carro and Miller, 2002; Ipharraguerre et al., 2007). As shown in Table 4.5.5.,  $^{15}\text{N}$  enrichment in LAB isolated from sheep was greater ( $P < 0.001$ ) for HF than for HC diets, but differences due to F:C ratio in the diet did not reach the significance level in fermenters ( $P = 0.06$ ). In both systems,  $^{15}\text{N}$  enrichment of LAB and SAB was greater for G compared with A diets, possibly due to the greater  $^{15}\text{N}$  enrichment of the  $\text{NH}_3\text{-N}$  fraction observed for G diets (results not shown).

The proportion of LAB-N derived from  $\text{NH}_3\text{-N}$  fraction in sheep was greater for HF than for HC diets, and for G compared with A diets, but no differences due to F:C ratio ( $P = 0.31$ ) or type of FOR ( $P = 0.93$ ) were observed in fermenters. In both systems, G diets promoted a greater capture of  $^{15}\text{NH}_3\text{-N}$  by SAB compared with A diets ( $P < 0.001$  and  $0.003$  for sheep and fermenters, respectively), although  $^{15}\text{NH}_3\text{-N}$  capture was 1.7 times greater in sheep compared with fermenters (mean value for all diets).

A lower enrichment of SAB compared with LAB has been often reported *in vivo* (Ipharraguerre et al., 2007) and in Rusitec fermenters (Gómez et al., 2005; Carro and Miller, 2002). In paired *t* tests within each fermentation system (*in vivo* or *in vitro*),  $^{15}\text{N}$  enrichment was lower ( $P < 0.001$ ) in SAB than in LAB (mean values of 0.0793 and 0.0893 atoms % in excess in sheep, and 0.2761 and 0.6317 atoms % in excess in fermenters). Whereas LAB are located in free suspension or loosely associated with fibers, SAB are located bound to plant surfaces, where the actual ammonia concentration may be lower than in rumen fluid and could fluctuate widely. As a consequence of the differences in  $^{15}\text{N}$  enrichment between bacterial fractions, the proportion of bacterial N derived from  $\text{NH}_3\text{-N}$  was greater in LAB than in SAB in sheep

(42.3 vs. 39.2%;  $P = 0.007$ ) and in fermenters (53.0 vs. 22.7%;  $P < 0.001$ ). The observed differences in  $^{15}\text{N}$  specific enrichment of SAB and LAB emphasize the necessity of a differential study of these 2 bacterial populations in order to obtain a reliable estimate of total microbial protein synthesis *in vivo* and *in vitro*.

The microbial N flow in sheep was greater ( $P < 0.001$ ) for HC compared with HF diets, whereas HF diets promoted greater ( $P < 0.001$ ) microbial growth than HC diets in fermenters. The greater microbial N flow observed in sheep fed HC diets could be partially explained by the greater intakes of energy and N (see Table 4.5.1.), as the yield of microbial biomass is related to the amount of available energy and N. The lower microbial growth observed in fermenters fed HC diets is hard to explain, but it might be related to the different retention times of forage and concentrate in the Rusitec system. As shown in Table 4.5.5., bacterial colonization of solid digesta was greater for HF than for HC diets (22.1 vs. 15.7%), which may be due to the longer retention time of forage compared with concentrate (48 vs. 24 h). As a consequence, SAB growth was greater in HF-fed fermenters than in those fed HC diets (186 and 125 mg/d, respectively; data now shown). The greater energy and N content in A diets compared with diets containing G could also explain the greater microbial growth observed *in vivo* ( $P = 0.003$ ) and *in vitro* ( $P = 0.009$ ) for A diets.

The values of efficiency of microbial synthesis, expressed as g of microbial N per kg OM apparently digested in the rumen, were in the range of those found in the literature in sheep fed diets differing in F:C ratio (Perez et al., 1996; Archimède et al., 1997), and were lower ( $P < 0.001$ ) for HF than for HC diets. In contrast, efficiency of microbial growth was lower ( $P = 0.003$ ) in fermenters fed HC diets compared with those receiving HF diets, due to the greater microbial growth in HC-fed fermenters and the lack of differences between HF and HC diets in the amount of OM digested in the rumen (9.12 vs. 8.71 g/d, respectively; values not shown). In sheep, the diet HFG had the lowest ( $P < 0.05$ ) efficiency of microbial growth, probably due to a limitation of microbial growth caused by the low N content in the diet (see Table 4.5.1.). However, no differences in the efficiency of microbial growth among HFG, HCA and HCG diets were observed in fermenters, despite that  $\text{NH}_3\text{-N}$  values were lowest in HFG-fermenters (see Table 4.5.2.).

**Table 4.5.5.** N content and <sup>15</sup>N enrichment of liquid-associated (LAB) and solid-associated (SAB) bacteria, proportion of bacterial-N derived from NH<sub>3</sub>-N, bacterial colonization of solid digesta, microbial N flow, and efficiency of microbial synthesis (EMS) in sheep and Rusitec fermenters receiving diets differing in forage:concentrate ratio (F:C) and type of forage (FOR).

Item <sup>2</sup>	FS	Diet <sup>1</sup>				SEM	Significance of effects ( <i>P</i> = )		
		HFA	HFG	HCA	HCG		F:C	FOR	F:C x FOR
N content of LAB, mg/g DM,	Rumen	64.7	69.2	63.7	66.2	1.62	0.26	0.07	0.57
	Fermenters	64.1 <sup>a</sup>	64.2 <sup>a</sup>	73.1 <sup>b</sup>	70.7 <sup>b</sup>	0.87	< 0.001	0.26	0.20
N content of SAB, mg/g DM	Rumen	66.4	66.7	65.0	67.2	1.18	0.70	0.33	0.44
	Fermenters	59.7	60.7	63.6	61.6	1.08	0.08	0.70	0.23
<sup>15</sup> N enrichment, atoms % excess									
LAB	Rumen	0.0725 <sup>b</sup>	0.1372 <sup>d</sup>	0.0604 <sup>a</sup>	0.0871 <sup>c</sup>	0.00332	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	Fermenters	0.4170 <sup>a</sup>	0.8255 <sup>d</sup>	0.5300 <sup>a</sup>	0.7541 <sup>c</sup>	0.00873	0.06	< 0.001	< 0.001
SAB	Rumen	0.0609 <sup>a</sup>	0.1175 <sup>c</sup>	0.0581 <sup>a</sup>	0.0808 <sup>b</sup>	0.00424	0.004	< 0.001	0.007
	Fermenters	0.1459 <sup>a</sup>	0.3674 <sup>c</sup>	0.2352 <sup>b</sup>	0.3557 <sup>c</sup>	0.00583	0.001	< 0.001	< 0.001
Proportion of LAB-N derived from NH <sub>3</sub> -N, %	Rumen	37.8 <sup>a</sup>	51.8 <sup>c</sup>	35.4 <sup>a</sup>	44.1 <sup>b</sup>	1.18	0.005	< 0.001	0.06
	Fermenters	53.6	53.6	52.5	52.4	1.03	0.31	0.93	0.97
Proportion of SAB-N derived from NH <sub>3</sub> -N, %	Rumen	33.8 <sup>a</sup>	46.8 <sup>c</sup>	35.4 <sup>a</sup>	40.6 <sup>b</sup>	1.42	0.15	< 0.001	0.03
	Fermenters	18.8 <sup>a</sup>	23.9 <sup>b</sup>	23.3 <sup>b</sup>	24.7 <sup>b</sup>	0.61	0.008	0.003	0.03
Bacterial colonization of solid digesta, % of digesta DM	Rumen	21.2 <sup>a</sup>	19.8 <sup>a</sup>	25.9 <sup>b</sup>	25.3 <sup>b</sup>	1.07	0.003	0.38	0.72
	Fermenters	22.9 <sup>b</sup>	21.3 <sup>b</sup>	16.0 <sup>a</sup>	15.3 <sup>a</sup>	0.96	0.001	0.28	0.65
Microbial N flow, g/d	Rumen	13.7 <sup>b</sup>	9.8 <sup>a</sup>	17.0 <sup>c</sup>	15.5 <sup>bc</sup>	0.55	< 0.001	0.003	0.07
	Fermenters	0.300 <sup>c</sup>	0.256 <sup>b</sup>	0.234 <sup>a</sup>	0.224 <sup>a</sup>	0.0064	< 0.001	0.009	0.05
EMS, g microbial N/kg OM apparently digested in the rumen	Rumen	22.6 <sup>b</sup>	19.2 <sup>a</sup>	33.3 <sup>c</sup>	31.4 <sup>c</sup>	0.80	< 0.001	0.02	0.39
	Fermenters	31.9 <sup>b</sup>	28.9 <sup>a</sup>	25.9 <sup>a</sup>	26.7 <sup>a</sup>	0.78	0.003	0.02	0.10

<sup>a, b, c</sup> Within each row, means with different superscripts differ (*P* < 0.05; Tukey's test).

<sup>1</sup> HFA: 70:30 alfalfa hay:concentrate; HFG: 70:30 grass hay:concentrate; HCA: 30:70 alfalfa hay:concentrate; HCG: 30:70 grass hay:concentrate. DM basis.



## CONCLUSIONS

There were differences between sheep and fermenters in the magnitude of most parameters, and only pH and concentrations of total VFA showed similar values in both systems. As assessed by post-feeding changes in pH and total VFA concentrations, fermenters had a slower feed fermentation compared with sheep. When differences among diets due to the type of forage were analyzed, interpretation of results *in vivo* and *in vitro* was similar for most of measured parameters. On the contrary, there were differences between *in vivo* and fermenters in the interpretation of the effects of F:C ratio in about half of the measured parameters, including the efficiency of microbial growth, and therefore interpretation of results was changed. Some of the discrepancies could be attributed to the lack of absorption in fermenters, differences in solids retention time, and the way of operation of Rusitec fermenters. Studies identifying the changes in microbial populations through the incubation period in Rusitec system are needed to understand the observed differences.

## LITERATURE CITED

- Archimède, H., D. Sauvant, and P. Schmidely. 1997. Quantitative review of ruminal and total tract digestion of mixed diet organic matter and carbohydrates. *Reprod. Nutr. Develop.* 7:173-189.
- Association of Official Analytical Chemists. AOAC, 1999. Official Methods of Analysis, 16th Edition, 5<sup>th</sup> revision. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Blanchart, G., M. Durant, J. L. Barry, M. Bouillier-Oudot, and J. P. Jouany. 1989. Intérêts et limites des fermenteurs à flux semi-continu de type Rusitec dans l'étude des fermentations du rumen (Advantages and limits of the semi-continuous artificial rumen (Rusitec) for the study of rumen fermentation). *Ann. Zootech.* 38:285-314.
- Brossard, L., C. Martin, and B. Michalet-Doreau. 2003. Ruminal fermentative parameters and blood acid-basic balance changes during the onset and recovery of induced latent acidosis in sheep. *Anim. Res.* 52:513-530.
- Carro, M. D., and E. L. Miller. 1999. Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semicontinuous culture system (RUSITEC). *Br. J. Nutr.* 82:149-157.

- Carro, M. D., and E. L. Miller. 2002. Comparison of microbial markers ( $^{15}\text{N}$  and purine bases) and bacterial isolates for the determination of rumen microbial protein synthesis. *Anim. Sci.* 75:315-321.
- Carro, M. D., C. Valdés, M. J. Ranilla, and J. S. González. 2000. Effect of forage to concentrate ratio in the diet on ruminal fermentation and digesta flow kinetics in sheep. *Anim. Sci.* 70:127-134.
- Carro, M. D., M. J. Ranilla, A. I. Martin-Garcia, and E. Molina-Alcaide. 2009. Comparison of microbial fermentation of high- and low-forage diets in Rusitec, single-flow continuous-culture fermenters and sheep rumen. *Animal.* 3:4:527-534.
- Carulla, J. E., C. R. Soliva, and A. Machmüller. 2003. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Anim. Feed Sci. Technol.* 109:79-94.
- Cheng, K. J., and T. A. McAllister. 1997. Compartmentation in the rumen. Pages 492–522 in *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson and C. S. Stewart, ed. Blackie Acad. Prof., London, UK.
- Czerkawski, J. W., and G. Breckenridge. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 38:371-384.
- Czerkawski, J. W., and G. Breckenridge. 1979. Experiments with the long-term rumen simulation technique (Rusitec); response to supplementation of basal rations. *Br. J. Nutr.* 42:217-228.
- Fadel, J.G. 1992. *In vitro* buffering capacity changes of seven commodities under controlled moisture and heating conditions. *J. Dairy Sci.* 75:1287-1295.
- Faichney, G. J. 1975. The use of markers to partition digestion within the gastrointestinal tract of ruminants. Pages 277-291 in *Digestion and Metabolism in the Ruminant*. A. C. I. Warner and I. W. McDonald, ed. University of New England Publishing Unit, Armidale NSW, Australia.
- Giraldo, L. A., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, S. Ramos, and M. D. Carro. 2008. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. *J. Anim. Sci.* 86:1617-1623.
- Gizzi, G., R. Zanchi, and F. Sciaraffia. 1998. Comparison of microbiological and fermentation parameters obtained with an improved rumen *in vitro* technique with those obtained *in vivo*. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 73:291-305.

- Gómez J. A., M. L. Tejido, and M. D. Carro. 2005. Mixed rumen micro-organisms growth and rumen fermentation of two diets in RUSITEC fermenters: influence of disodium malate supplementation. *Brit. J. Nutr.* 93:479-484.
- Hoover, W. H., B. A. Crooker, and C. J. Sniffen. 197. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43:528-534.
- Hristov, A. N., M. Ivan, L. M. Rode, and T. A. McAllister. 2001. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets. *J. Anim. Sci.* 79:515-524.
- Ipharraguerre, I. R., S. M. Reynal, M. Lineiro, G. A. Broderick, and J. H. Clark. 2007. A comparison of sampling sites, digesta and microbial markers, and microbial references for assessing the postruminal supply of nutrients in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1904–1919.
- Mackie, R. I., F. M. C. Gilchrist, A. M. Roberts, P. E. Hannah, and H. M. Schwartz. 1978. Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *J. Agric. Sci.* 90:241–254.
- Mansfield, H.R., M. I. Endres, and M. D. Stern. 1995. Comparison of microbial fermentation in the rumen of dairy cows and dual flow continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55:47-66.
- Martin, C., and B. Michalet-Doreau. 1995. Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms: Effect of barley and buffer supplements. *J. Sci. Food Agric.* 67:407–413.
- Martin, C., L. Millet, G. Fonty, and B. Michalet-Doreau. 2001. Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community associated with rumen solid digesta. *Reprod. Nutr. Dev.* 41:413–424.
- Martínez, M.E., M. J. Ranilla, M. L. Tejido, C. Saro, and M. D. Carro. 2010. 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.* (Submitted).
- Martínez, M.E., M. J. Ranilla, S. Ramos, M. L. Tejido, and M. D. Carro. 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.* 92:3930–3938.

- Muetzel, S., Lawrence, P., Hoffmann, E. M., and K. Becker. Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 151:32-43.
- NRC. 1985. *Nutrient Requirement of Sheep*. 6<sup>th</sup> ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Oliveira, L. A. de, C. Jean-Blain, S. Komisarczuk-Bony, A. Durix, and C. Durier. 1997. Microbial thiamin metabolism in the rumen simulating fermenter (RUSITEC): the effect of acidogenic conditions, a high sulfur level and added thiamine. *Brit. J. Nutr.* 78: 599-613.
- Pérez J. F., J. Balcells, J. A. Guada, and C. Castrillo. 1996. Determination of rumen microbial-nitrogen production in sheep: a comparison of urinary purine excretion with methods using <sup>15</sup>N and purine bases as markers of microbial-nitrogen entering the duodenum. *Brit. J. Nutr.* 75:699-709.
- Ranilla, M. J., and M. D. Carro. 2003. Diet and procedures used to detach particulate-associated microbes from ruminal digesta influence chemical composition of microbes and estimation of microbial growth in Rusitec fermenters. *J. Anim. Sci.* 81:537-544.
- Ranilla, M. J., S. López, F. J. Giráldez, C. Valdés and M. D. Carro. 1998. Comparative digestibility and digesta flow kinetics in two breeds of sheep. *Anim. Sci.* 66:389-396.
- Russell, J. B., and D.B. Wilson. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?. *J. Dairy Sci.* 79:1513-1509.
- Udén, P., P. E. Colucci, and P. J. Van Soest. 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rates of passage studies. *J. Sci. Food Agric.* 31:625-632.
- Valdés, C., M. D. Carro, M. J. Ranilla, and J. S. González. 2000. Effect of forage to concentrate ratio in complete diets fed to sheep on voluntary feed intake and some digestive parameters. *Anim. Sci.* 70:119-126
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Weller, R. A., and A. F. Pilgrim. 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of the sheep and from a continuous *in vitro* fermentation system. *Brit. J. Nutr.* 32:341-351.

- Williams, C. H. D., D. J. David, and O. Iismaa. 1962. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *J. Agric. Sci.* 59:381-385.
- Ziemer, C. J., R. Sharp, M. D. Stern, M. A. Cotta, T. R. Whitehead, and D. A. Stahl. 2000. Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S ribosomal RNA-targeted probes. *Environ. Microbiol.* 1:632-643.



## **4.6. Prueba 6**

*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*





**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**

M.E. Martínez, M.J. Ranilla, M.L. Tejido, C. Saro and  
M.D. Carro

*Departamento de Producción Animal, Universidad de León,  
24071 León (Spain)  
Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas  
s/n. 24346 Grulleros, León (Spain)*

*Journal of Dairy Science (En evaluación)*



**ABSTRACT** Four ruminally and duodenally cannulated sheep and 8 Rusitec fermenters were used to determine the effects of dietary characteristics on microbial populations and bacterial diversity. The purpose of the study was to assess how closely fermenters can mimic the dietary differences found *in vivo*. The 4 experimental diets contained forage to concentrate (F:C) ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) with either alfalfa hay (A) or grass hay (G) as the forage. The automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) of the 16S ribosomal DNA was used to analyze the diversity of liquid-associated (LAB) and solid-associated (SAB) bacteria in both systems. Total bacterial numbers were greater in the rumen of HF-fed sheep compared with those fed HC diets, whereas the opposite was found in fermenters. The numbers of cellulolytic bacteria were not affected by F:C ratio in any fermentation system, but cellulolytic numbers were 2.7 and 1.8 times greater in sheep than in fermenters for HF and HC diets, respectively. Neither total bacterial nor cellulolytic numbers were affected by the type of forage in sheep or fermenters. Decreasing F:C ratio increased total protozoa and Entodiniinae numbers in sheep by about 29 and 25%, respectively, but it had no effect in fermenters. Isotrichidae and Ophryoscolecinae numbers in sheep were not affected by changing F:C ratio, but both disappeared completely from fermenters fed HC diets. Total protozoa and Entodiniinae numbers were greater in sheep fed A diets than in those fed G diets, whereas the opposite was found in fermenters. The results indicate that under the conditions of the present study, the protozoa population in Rusitec fermenters was not representative of that in the rumen of sheep fed the same diets. In addition, protozoa numbers in fermenters were 121 and 226 times lower than those in the sheep rumen for HF and HC diets, respectively. A total of 170 peaks were detected in the ARISA electropherograms of bacterial pellets across the full set of 64 samples, from which 160 were detected in at least 1 individual from each system (sheep or fermenter). Bacterial diversity in SAB pellets was greater for G compared with A diets in sheep and fermenters. Diversity of LAB was greater with G diets in fermenters, but seemed to be independent of the diet in sheep. The different conditions in the fermenters compared with sheep rumen might have caused a selection of some bacterial strains.

**Key words:** sheep, Rusitec fermenters, protozoa, ARISA, bacterial diversity

## INTRODUCTION

The rumen is an anaerobic microbial ecosystem which is inhabited by a complex microbial population including bacteria, protozoa, fungi and archaea. The study of microbial ecology is complicated by daily fluctuations in the environment, microenvironments within the rumen and the effects of animal physiology on the rumen (Ziemer et al., 2000). These difficulties have led to the development of *in vitro* techniques that intend to model ruminal fermentation, thereby allowing studies under well-controlled conditions. As pointed out by Ziemer et al. (2000), to be an adequate experimental tool, an artificial rumen should mimic the natural rumen in a number of ways including the physical environment (temperature, pH, turnover rates, etc.) and the maintenance of key microbial populations. Ideally, the composition of microorganisms in an *in vitro* system should be representative, in terms of quantity and quality, of that found in the rumen of the host animal. Although there are multiple *in vitro* techniques available, ruminal fermenters appear to be the most suitable for studying the ruminal ecosystem. One of the problems associated with fermenters is the maintenance of an active protozoal population. Protozoa survival is influenced by liquid turnover rate and by feeding frequency (Mansfield et al., 1995; Teather and Sauer, 1988; Ziemer et al., 2000). Dilution rates of more than 2 turnovers per day ( $0.084 \text{ h}^{-1}$ ) have been reported to decrease protozoa numbers, even in dual flow systems (Mansfield et al., 1995; Ziemer et al., 2000), and Teather and Sauer (1988) showed that changing feeding frequency from continuously to twice a day led to decreased protozoal counts in fermenters with continuous independent flow of liquid and particulate matter. To date, there are no fermenters which can maintain protozoa numbers similar to those found in the *in vivo* rumen. However, most studies have focused on total numbers of protozoa and proportion of Holotricha, but there are no studies on the diversity of ciliate protozoa in fermenters fed diets of variable composition.

An additional problem is that the total composition of the rumen microbial communities cannot be studied with traditional cultivation techniques. In the last years, molecular fingerprinting techniques such as denaturing gradient gel electrophoresis (**DGGE**), single strand conformation polymorphism (SSCP), terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) or automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) have been used to assess the richness and/or diversity of ruminal microbial communities (Ziemer et al., 2000; Muetzel et al., 2009; Martínez et al., 2009;

Ramos et al., 2009). The application of these techniques constitutes a useful tool to evaluate if fermenters produced a microbial community which represents the natural ecosystem in the rumen. However, to date little work has been done to compare microbial populations assessed by molecular techniques in fermenters with those in the *in vivo* rumen, and the results are contradictory. Ziemer et al. (2000) compared microbial populations in the rumen of the donor cow with those developed in dual-flow continuous culture fermenters receiving the same diet fed to the cow. Total rRNA concentration was 1.5 times greater in the fermenters than in the cow, and the average abundance of Bacteria, Archaea and Eukarya in the fermenters was 176, 172 and 3% of that found in the cow, indicating changes in microbial populations over the incubation period. More recently, Muetzel et al. (2009) developed a fermenter aimed to maintain an active protozoal population, and analyzed the relative abundance of microbial populations by slot blot hybridisation. Total rRNA concentration in the fermenters was lower than in the donor cows, and the proportions of the rRNA from Bacteria, Archaea and Eukarya in the fermenters were 96, 200 and 107% of those found in the cows. To our knowledge, only Prevot et al. (1994) have analyzed changes in microbial populations in Rusitec fermenters over the incubation period, and they concluded that fermenters could not maintain microbial populations in conditions comparable to those encountered *in vivo*, as proportions of bacteria and protozoa decreased to 30 and 1%, respectively, of those found *in vivo*. Clearly, the operating conditions in each type of fermenter can affect the evolution of microbial populations over the incubation period. Moreover, the microbial community fluctuates with changes in feed composition, but the host animal also influences the microbial population in the rumen, as well as the interactions within the community, and such influences cannot appropriately be mimicked *in vitro* (Firkins and Yu, 2006).

The objective of this study was to assess to what extent Rusitec fermenters can be used to characterize the effects of diet on microbial populations and bacterial diversity. For that purpose, the effects of 4 diets differing in F:C ratio and type of forage on microbial populations and bacterial diversity were assessed in sheep, and the results were compared with those observed in Rusitec fermenters given the same diets.

## **MATERIALS AND METHODS**

Diets, animals, fermenters and experimental procedures are detailed described in a companion paper (Martínez et al., 2010), and are summarized below.

## Diets

Four total mixed diets were formulated according to a 2 × 2 factorial arrangement of treatments. The diets had F:C (DM basis) ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) with either alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage, and were designated as HFA, HFG, HCA and HCG, respectively. Ingredients and chemical composition of diets are shown in Table 4.6.1. The alfalfa hay was a second-cut harvested at 30% flowering and contained 91.3% DM, 2.67% N, 46.6% NDF, and 33.1% ADF (DM basis). The grass hay consisted primarily of perennial ryegrass (81%), red and white clover (11%), and other grasses (8%); was harvested at post-flowering stage; and contained 93.3% DM, 1.46% N, 56.9% NDF, and 28.6% ADF (DM basis). The concentrate contained 91.4% DM, 3.04% N, 33.5% NDF, and 12.5% ADF (DM basis).

**Table 4.6.1.** Ingredients and chemical composition of the 4 experimental diets with F:C ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage.

Item	HFA	HFG	HCA	HCG
Ingredient, % of DM				
Alfalfa hay	70	-	30	-
Grass hay	-	70	-	30
Barley	6.4	6.4	15.2	15.2
Gluten feed	6.1	6.1	14.5	14.5
Wheat middlings	5.7	5.7	13.7	13.7
Soybean meal	4.1	4.1	9.7	9.7
Palmkern meal	3.8	3.8	9.0	9.0
Wheat	1.5	1.5	3.5	3.5
Corn	1.5	1.5	3.5	3.5
Vitamin-Mineral premix <sup>1</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0
Chemical composition				
DM, %	92.7	92.5	92.5	92.4
OM, % of DM	91.3	92.7	91.3	91.9
N, % of DM	2.69	1.94	2.83	2.56
NDF, % of DM	42.6	49.9	37.4	40.1
ADF, % of DM	26.9	23.8	18.7	17.4
ME, <sup>2</sup> Mcal/kg of DM	2.12	2.00	2.45	2.39

<sup>1</sup> Vitamin-mineral premix contained per kilogram of DM: 11,250 IU of vitamin A; 2,250 IU of vitamin D<sub>3</sub>; 25 mg of Vitamin E; and 10 mg of CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O.

<sup>2</sup> Estimated according to the NRC (1985).

## *In vivo trial*

### *Animals and Experimental Procedure*

Four ruminally and duodenally cannulated Merino sheep ( $58.5 \pm 3.16$  kg BW) were used. Animals were cared and handled in accordance with the Spanish Animal Care Regulations, and the experimental protocols were approved by the León University Institutional Animal Care and Use Committee. Sheep were housed in individual pens and had continuous access to fresh water and vitamin/mineral block over the experimental period. Diets were offered to the animals twice daily (0800 and 2000 h) at a daily rate of 56 g of DM/kg of BW<sup>0.75</sup> to minimize feed selection. This level of intake was estimated to meet 1.2, 1.1, 1.4, and 1.3 times the energy maintenance requirements of the experimental sheep for HFA, HFG, HCA, and HCG diets, respectively (NRC, 1985).

The experimental design was a 4 x 4 Latin square, and each 25-d experimental period consisted of 14 d of dietary adaptation and 11 d (d 15 to 25) for sample and data collection. On d 15 of each period, about 400 g of ruminal contents were taken through the cannula of each sheep immediately before the morning feeding and strained through 4 layers of cheesecloth. Five mL of ruminal fluid were added to 5 mL of methylgreen-formalin solution (Ogimoto and Imai, 1981) and stored at room temperature in the dark until protozoa counting. One mL of ruminal fluid was diluted through a series of tubes containing 9 mL of anaerobic dilution solution (Dehority, 1969). Using the 10<sup>-6</sup> through 10<sup>-11</sup> dilution tubes, 1 mL was placed in each of 3 tubes containing the Most Probable Number media and 24-h ball-milled cellulose (Sigmacell-20; Sigma-Aldrich Chemical S.A., Madrid, Spain). Tubes were incubated at 39°C for 15 d. Total and cellulolytic bacteria concentrations were determined from the decrease in pH and by visual loss of cellulose, respectively, according to the Most Probable Number procedure for enumerating bacteria described by Dehority et al. (1989).

The solid digesta was combined with 100 mL of saline solution (0.9% NaCl) at 38°C, mixed gently, and squeezed again to remove residual liquid-associated bacteria (LAB). The procedure was repeated and the solution added to the ruminal fluid before isolation of LAB by differential centrifugation (Ranilla and Carro, 2003). The solid digesta (100 g) was incubated with saline solution (0.9% NaCl; 3 mL per g of digesta) containing 0.1% methylcellulose at 38°C for 15 min in a continuous-shaking water bath (65 strokes per min), then 50 mL of cold (4°C) saline solution containing 0.1%

methylcellulose were added, and the material was stored at 4°C for 24 h. The samples were homogenized for 10 s with a Waring Blender, centrifuged at 500 x g for 10 min at 4°C, and the supernatant fraction was removed and retained. The solids were resuspended two times in saline solution (0.9% NaCl) containing 0.1% methylcellulose, and then recentrifuged (500 x g for 10 min at 4°C). The final filtrates were then centrifuged at 29,000 x g for 25 min at 4°C to isolate solid-associated bacteria (SAB). The pellets were washed by resuspension in saline solution, and the centrifugation was repeated. Bacterial pellets were freeze-dried and analyzed for bacterial diversity by ARISA.

From d 16 to 25 ruminal digestibility, main fermentation parameters and microbial protein synthesis were determined, and the results are reported in a companion paper (Martínez et al., 2010).

### ***In vitro trial***

Two identical 16-d incubation trials were carried out using 8 Rusitec fermenters (Czerkawski and Breckenridge, 1977). Fermenters had an effective volume of 600 mL, and the general incubation procedure was as described by Martínez et al. (2009). Treatments were assigned randomly so that in each run 2 fermenters received each of the diets. The inoculum was obtained from 8 ruminally fistulated sheep ( $59.2 \pm 3.51$  kg BW). Two sheep received each of the 4 experimental diets for 14 d before starting the *in vitro* trial. Each fermenter received daily 30 g of DM of the corresponding diet (Table 4.6.1.). Hay was chopped (approximately at 0.5-cm pieces), and the concentrate was ground through a 3-mm sieve. Forage and concentrate were fed into separate nylon bags (100- $\mu$ m pore; 8 x 15 cm) and remained into the fermenters for 48 and 24 h, respectively. The flow through fermenters was maintained by continuous infusion of artificial saliva at a rate of 740 mL/day (dilution rate of 5.14%/h).

On d 10, 11, 12, 13 and 14, ruminal digestibility, main fermentation parameters and microbial protein synthesis were determined, and the results are reported in a companion paper (Martínez et al., 2010). On d 15 of each period, 5 mL of ruminal fluid were taken for protozoa counting, and 1 mL of ruminal fluid was used to determine total and cellulolytic bacteria concentrations following the procedures described in the *in vivo* trial. On day 16, the content of the 2 nylon bags (one with forage and one with concentrate) collected daily from each fermenter was mixed and used to isolate SAB.



Approximately 400 mL of fermenters content were used for isolation of liquid-associated bacterial pellets (LAB). Isolation of SAB and LAB followed the procedures described in the *in vivo* trial.

### ***Analyses of Bacterial Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA)***

In order to analyze the effect of dietary treatments on bacterial communities in LAB and SAB isolates, DNA was isolated from bacterial pellets (30 mg of DM) as described by Yu and Morrison (2004). Extracted DNA was amplified using universal bacterial primers 16S-1392F and 23S-125R (Danovaro et al., 2006; synthesized by Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, Spain), which amplify the ITS1 region in the rRNA operon plus ca. 282 bases of the 16S and 23S RNA. Primer 23S-125R was fluorescently labelled with the phosphoramidite dye 6-FAM. Each PCR mix (50  $\mu$ L final volume) contained 1 x PCR reaction buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25  $\mu$ M of each primer, each deoxynucleotide triphosphate at a concentration of 0.2 mM, and 2.5 U of Taq Polymerase (Biotools B&M Labs SA, Madrid, Spain). Thermocycling was conducted in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), and started with an initial cycle of denaturation (94°C for 3 min), followed by 30 cycles of denaturation (94°C for 60 s), annealing (55°C for 60 s) and elongation (72°C for 120 s), ending with a final extension step at 72°C for 2 min. The PCR products were analyzed for size and quantity by electrophoresis in 1.5% agarose gels, and further purified using a Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Eluted DNA was quantified fluorimetrically using a Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Delaware, USA). For each ARISA, about 5 ng of amplicons were mixed with an internal size standard (GS 1200 LIZ, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in deionized formamide, then denatured at 94°C for 2 min, and immediately chilled on ice. Automated detection of ARISA fragments was carried out using an ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with 36-cm by 50- $\mu$ m capillary and POP-7 polymer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Peak size and area were estimated by comparison with the internal size standard using the GeneMaker Software v1.80 (SoftGenetics, State College, PA, USA). To include the maximum number of peaks while excluding background fluorescence, a threshold of 100 fluorescence units was used.

It was considered that the peak profile in ARISA electropherograms reflects the predominant bacterial species or populations present in bacterial pellets, and only the

presence/absence of the different peaks was considered for the analysis. The Shannon's diversity index was calculated as described by Shannon and Weaver (1949) per each group of samples (*in vivo* and *in vitro*), and was used to evaluate the diversity of bacterial communities. To analyze the similarity between bacteria isolated from the liquid and the solid phase, a percent similarity index was calculated from the peak profile patterns in the electropherograms of LAB and SAB pellets isolated from each individual (sheep or fermenter) within dietary treatment. Dendrograms were constructed using the Pearson product-moment correlation coefficient and unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) options in the MVSP v3.12d software (Kovach Computing Service, Anglesey, Wales, UK). Principal components analysis (PCA) was performed by using the same software.

### ***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 and ADF analyses were carried out according to Van Soest et al. (1991) using an ANKOM<sup>220</sup> Fibre Analyzer unit (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA). Sodium sulphite and heat-stable amylase were used in analysis of NDF and ADF, and they were expressed inclusive of residual ash.

Ciliate protozoa in preserved rumen fluid samples were counted using a Neubauer Improved Bright-Line counting cell (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA). Family Isotrichidae and Family Ophryoscolecidae (including subfamilies Entodiniinae, Diplodiniinae, and Ophryoscolecinae) were identified following descriptions by Dehority (1993), and their numbers were separately recorded. Duplicate preparations of each sample were counted, and, if either value differed from the average by more than 10%, the counts were repeated.

### ***Calculations and Statistical Analyses***

*In vivo* and *in vitro* data were analyzed separately to assess the effects of dietary treatments on each fermentation system. Data from *in vivo* trial were analyzed according to a 4 x 4 Latin square model using the MIXED procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) according to the following model:

$$Y_{ijkl} = \mu + c_i + P_j + FC_k + F_l + FCF_{kl} + e_{ijkl},$$

where  $Y_{ijkl}$  = the dependent variable,  $\mu$  = the overall mean;  $c$  = the random effect of sheep ( $i = 1$  to 4);  $P$  = the fixed effect of period ( $j = 1$  to 4);  $FC$  = the fixed effect of F:C

( $k = 1$  to  $2$ );  $F$  = the fixed effect of FOR ( $l = 1$  to  $2$ ); FCF = the interaction of F:C and FOR; and  $e$  = the residual error. In the analysis of *in vitro* data the random effect of fermenter was  $i = 1$  to  $8$ , and the fixed effect of period  $j = 1$  to  $2$ . When a significant effect of treatment ( $P \leq 0.05$ ) was detected, differences among means were tested using the Tukey's multiple comparison test.

## RESULTS AND DISCUSSION

The main objective of the present study was to assess the ability of Rusitec fermenters to maintain a microbial population representative of that found in the rumen of sheep fed diets of contrasting quality. Because ruminal microbial populations have been shown to change with time after feeding (Firkins and Zhu, 2006), we made an effort to obtain ruminal samples at times that were comparable in both fermentation systems. Sheep were fed twice to resemble practical feeding conditions; in contrast, Rusitec fermenters are usually fed only once daily, because feeding implies the exposure of fermenters contents to oxygen, which is toxic to anaerobic rumen bacteria and inhibits bacterial growth and the adhesion of cellulolytic bacteria to fibre (Roger et al., 1990). Therefore, we decided to take samples of rumen contents immediately before feeding in fermenters and before the morning feeding in sheep.

### ***Bacterial and Protozoal Numbers***

As shown in Table 4.6.2., total bacteria numbers were greater ( $P = 0.007$ ) in the rumen of HF-fed sheep compared with sheep fed HC diets, whereas HF-fermenters had lower ( $P = 0.02$ ) bacterial concentrations than HC-fermenters. The greater bacteria numbers observed in the HC-fermenters compared with HF-fermenters are in contrast with the lower daily microbial flow observed in HC fermenters in a previous study ( $P < 0.001$ ; Martínez et al., 2010). However, it has to be taken into account that total bacterial numbers were determined in the ruminal fluid, and bacteria attached to feed particles can constitute a major proportion of the total bacteria in the rumen. This would also explain why sheep fed HC concentrate diets had greater ( $P < 0.001$ ) microbial flows than those fed HF diets (Martínez et al., 2010), but lower total bacteria numbers in the ruminal fluid. The results indicate that Rusitec fermenters did not reproduce the shifts in bacteria numbers induced by changing the F:C ratio in the diet of sheep. Moreover, total bacteria numbers were 1.4 and 4.9 times greater in Rusitec than in sheep for HF and HC diets, respectively. This is in agreement with Mansfield et al.

(1995) who observed that concentrations of viable bacterial were 1.8 times greater in dual flow continuous culture fermenters than in the rumen of cows. These authors attributed the observed differences to fermenters defaunation, as protozoa moderate ruminal fermentation by reducing bacterial numbers and activity through predation and competition for substrates. In contrast, Muetzel et al. (2009) observed that the total rRNA concentration in single-flow continuous culture fermenters was significantly lower than in the donor cows, although the proportion of the rRNA from the domain Bacteria in the fermenters did not differ from that in the donor animals, and Gizzi et al. (1998) observed that total bacteria numbers were similar in the rumen of cows and in an improved rumen simulation technique of the batch type operating up to 24 h. Differences among the different types of *in vitro* systems can help to explain these contrasting results.

The numbers of cellulolytic bacteria were not affected by F:C in sheep ( $P = 0.85$ ) or Rusitec ( $P = 0.15$ ), which is in agreement with other results (Mackie et al., 1978; Leedle et al., 1986) showing that the number of cellulolytic bacteria, determined by the classical culture-based techniques (Dehority, 1969), remained stable when the concentrate proportion in the diet increased. Martin et al. (2001) found that the detrimental effect of concentrates on fiber degradation was not due to a modification of the balance of the cellulolytic bacteria, but only to a specific decrease in their fibrolytic activity, which is in agreement with our results. However, it has to be noticed that the number of cellulolytic bacteria in our study was determined in ruminal fluid, although most of cellulolytic bacteria in the rumen are attached to feed particles (Stewart et al., 1997). In agreement with previous studies (Mansfield et al., 1995; Muetzel et al., 2009), cellulolytic numbers were 2.7 and 1.8 times greater in the rumen than in fermenters for HF and HC diets, respectively. Rusitec fermenters are opened once per day to introduce new nylon bags with substrate, thus exposing the ruminal microorganisms to oxygen and, therefore, to a substantial stress situation for the strict anaerobic ones (Gizzi et al., 1998), such as the cellulolytic bacteria.

Neither total bacterial nor cellulolytic numbers were affected by FOR in sheep ( $P = 0.89$  and  $0.31$ , respectively) or fermenters ( $P = 0.96$  and  $0.87$ ). No interactions F:C x FOR ( $P = 0.24$  to  $0.92$ ) were observed for bacterial and protozoal populations in either sheep rumen or Rusitec, which indicates that changes in microbial populations in response to increasing proportions of concentrate in the diet were not influenced by the basal forage.

**Table 4.6.2.** Bacterial and protozoal numbers in the rumen of sheep and Rusitec fermenters receiving diets differing in forage:concentrate ratio (F:C) and type of forage (FOR).

Item	FS	Diet <sup>1</sup>				SEM	Significance of effects ( <i>P</i> = )		
		HFA	HFG	HCA	HCG		F:C	FOR	F:C x FOR
Bacterial numbers:									
Total bacteria, x 10 <sup>8</sup> /mL	Rumen	1.27 <sup>b</sup>	1.20 <sup>b</sup>	0.63 <sup>a</sup>	0.74 <sup>a</sup>	0.114	0.007	0.89	0.53
	Fermenters	1.91 <sup>a</sup>	1.67 <sup>a</sup>	3.20 <sup>b</sup>	3.53 <sup>b</sup>	0.417	0.02	0.96	0.62
Cellulolytic bacteria x 10 <sup>6</sup> /mL	Rumen	5.15	7.23	5.33	6.48	1.449	0.85	0.31	0.76
	Fermenters	2.35	2.31	3.30	3.15	0.527	0.15	0.87	0.92
Protozoal numbers, x 10 <sup>3</sup> /mL									
Total protozoa	Rumen	1189 <sup>bc</sup>	746 <sup>a</sup>	1462 <sup>c</sup>	1042 <sup>b</sup>	113.9	0.03	0.004	0.92
	Fermenters	6.97 <sup>b</sup>	8.96 <sup>b</sup>	3.11 <sup>a</sup>	7.96 <sup>b</sup>	1.361	0.11	0.03	0.27
Entodiniinae	Rumen	1092 <sup>bc</sup>	676 <sup>a</sup>	1317 <sup>c</sup>	896 <sup>ab</sup>	101.2	0.06	0.003	0.98
	Fermenters	6.63 <sup>ab</sup>	8.82 <sup>b</sup>	3.11 <sup>a</sup>	7.96 <sup>ab</sup>	1.350	0.15	0.03	0.31
Isotrichidae	Rumen	48.5	48.1	50.7	58.2	12.17	0.63	0.78	0.75
	Fermenters	0.17 <sup>b</sup>	0.07 <sup>ab</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.036	0.009	0.20	0.20
Diplodiniinae	Rumen	40.4 <sup>ab</sup>	19.4 <sup>a</sup>	71.2 <sup>bc</sup>	78.4 <sup>c</sup>	11.17	< 0.001	0.55	0.24
	Fermenters	0.16 <sup>c</sup>	0.07 <sup>b</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.020	< 0.001	0.03	0.30
Ophryoscolecinae	Rumen	8.30	2.31	22.9	9.61	5.965	0.10	0.14	0.56
	Fermenters	0.00	0.00	0.00	0.00	-	-	-	-

<sup>a, b, c</sup> Within each row, means with different superscripts differ (*P* < 0.05; Tukey's test).

<sup>1</sup> HFA: 70:30 alfalfa hay:concentrate; HFG: 70:30 grass hay:concentrate; HCA: 30:70 alfalfa hay:concentrate; HCG: 30:70 grass hay:concentrate. DM basis.

Total protozoa numbers were in the range of those previously reported for sheep (Santra et al., 1998; Brossard et al., 2004; Table 4.6.2.) and Rusitec fermenters fed diets of different quality (Carro et al., 1992, 1995). Total concentration of protozoa in ruminal fluid generally increases with the addition of concentrate to forage diets (Franzolin and Dehority, 1996; Brossard et al., 2003), and in our study increasing concentrate from 30 to 70% augmented ( $P = 0.03$ ) protozoa numbers by 20 and 40% for A and G diets, respectively. In contrast, F:C ratio had no effect ( $P = 0.11$ ) on total protozoa numbers in fermenters. Sequestration of protozoa among particulate digesta has been identified as an important factor in maintaining protozoa populations in fermenters (Nakamura and Kurihara, 1978), and the Rusitec system has a semi-continuous outflow of particles that allows a better retention of protozoa compared with other types of fermenters. In the present study a different retention time of solid digesta was used for forage and concentrate (48 and 24 h, respectively), which implies that retention time for HC diets was lower than that for HF diets, and this may have contributed to the lack of differences between HF and HC-fermenters in protozoa numbers. In agreement with this hypothesis, Crawford et al. (1980) observed that continuous-flow fermenters with a solid digesta retention time of 29.7 h maintained relatively stable levels of  $1.0 \times 10^4$  protozoa/mL, but decreasing solids retention time to 22.0 and 14.3 h reduced protozoa numbers by 100 and 250 times, respectively. In agreement with the literature in sheep (Santra et al., 1998; Dehority, 2003) Entodiniinae represented 86 and 92% of total protozoa in sheep fed HF and HC diets, respectively. Entodiniinae were also the most abundant protozoa in Rusitec fermenters, representing 97 and 100% of total protozoa for HF and HC diets, respectively, which is in accordance with other studies (Slyter and Putnam, 1967; Carro et al., 1992, 1995). In general, a reduction in Isotrichidae, Diplodiniinae, and Ophryoscolecinae numbers has been reported by feeding HC diets to ruminants, due to the low ruminal pH values produced by the rapid fermentation of non-structural carbohydrates (Franzolin and Dehority, 1996; Hristov et al., 2001). In our study, Isotrichidae protozoa were not affected by F:C ratio ( $P = 0.63$ ), but Diplodiniinae numbers were greater ( $P < 0.001$ ) and Ophryoscolecinae numbers tended to be greater ( $P = 0.10$ ) in HC-fed sheep than in those fed HF diets, which may have been due to the relatively high pH values (above 5.70) observed in HC-fed sheep in our study (Martínez et al., 2010). The results indicate that feeding up to 70% of concentrate did not have any detrimental effect on any of the protozoa groups identified in our study in sheep. In contrast, Isotrichidae and

Diplodiniinae disappeared completely in the fermenters fed HC diets, although they were maintained in HF-fed fermenters. The complete disappearance of Isotrichidae in HC-fed fermenters may be pH related. Eadie (1962) found that Isotrichidae did not develop in the rumen of calves and sheep at pH below 6.5. Whereas in HF-fermenters values did not drop below 6.44 and 6.11 in fermenters fed HFA and HFG, respectively, minimum values were 5.76 and 5.74 in fermenters fed HCA and HCG, respectively (Martínez et al., 2010). In agreement with this hypothesis, Carro et al. (1995) found that Isotrichidae represented 12.2 % of total protozoa in Rusitec fermenters maintained at pH 6.86, but they completely disappeared when the pH dropped to 6.17 by changing the composition of the artificial saliva infused into the system.

The disappearance of Ophryoscolecinae from all fermenters may be partially explained by their long generation time and large size. Retention time of solid digesta in fermenters was 24 and 48 h for concentrate and forage, respectively, which is shorter than the generation times up to 3 d observed for Ophryoscolecinae (Sylvester et al., 2009). Ophryoscolecinae are one of the largest ruminal protozoa and can measure up to 200  $\mu\text{m}$  in length (Williams et al., 1961). The pore size of nylon bags (100  $\mu\text{m}$ ) used in Rusitec fermenters probably limited the entrance of Ophryoscolecinae into the bags and their attachment to digesta.

Both total protozoa and Entodiniinae numbers were greater ( $P = 0.004$  and  $0.003$ , respectively) in sheep receiving A diets than in those fed G diets. In contrast, fermenters fed A diets had lower total protozoa and Entodiniinae numbers ( $P = 0.03$ ) than G diets fed fermenters. These results seem to indicate that protozoa were retained more successfully in the unfermentable residues of G than in those from A, as it has been previously observed by Abe and Kurihara (1984). The type of forage in the diet did not affect ( $P = 0.14$  to  $0.78$ ) Isotrichidae, Diplodiniinae or Ophryoscolecinae numbers in sheep, but numbers of Diplodiniinae were greater in fermenters fed A diets compared with G-fermenters.

The results indicate that under the conditions of the present study, the protozoa population in Rusitec fermenters was not representative of that found in the rumen of sheep fed the same diets. In addition, protozoa numbers in fermenters were 121 and 226 times lower than those in the sheep rumen for HF and HC diets, respectively, confirming previous observations (Mansfield et al., 1995; Muetzel et al., 2009). The lower numbers and diversity of protozoa in the fermenter may have played a role in

several of the observed discrepancies in fermentation parameters between the rumen and fermenters in a previous study (Martínez et al., 2010).

### ***Bacterial diversity***

The approach used in this study for assessing bacterial diversity differ from others that have compared microbial populations in the rumen with those in fermenters. Differences in chemical composition between SAB and LAB are widely demonstrated both in the rumen (Mery and McAllan, 1983; Ipharraguerre et al., 2007) and in fermenters (Carro and Miller, 2002; Molina-Alcaide et al., 2008), and there is a general agreement that SAB should be taken into account in determining microbial protein synthesis *in vivo* and *in vitro*. Because both bacterial fractions are usually isolated in studies measuring microbial growth in the rumen, we decided to analyze the bacterial diversity in both types of pellets. Whereas LAB are easy to isolate, SAB have to detached from feed particles and to date there is no consensus on the ideal method to obtain a representative SAB isolate. In previous studies conducted in our laboratory in sheep (Ramos et al., 2009) and Rusitec fermenters (Martínez et al., 2009) we compared 3 methods to detach SAB from solid ruminal digesta, and the results showed that the treatment of solid digesta with a solution of methylcellulose was the one that produced SAB pellets with the greatest similarity to the bacterial communities attached to the digesta; this procedure was therefore used to isolate SAB from ruminal digesta in both systems.

In the Rusitec system, the LAB are separated from the SAB, which are attached to feed enclosed in the nylon bags. An exchange between these bacterial fractions is made possible by the continuous perfusion of the solid by the liquid and by returning the washings from the removed bags to the fermenter. These washings contain a relative large proportion of loosely-attached microorganisms (Czerkawski and Breckenridge, 1977) which are returned to the liquid phase and isolated as LAB. Because it has been shown that processing method of ruminal digesta prior to DNA extraction has a profound effect on diversity results (Firkins and Yu, 2006), solid digesta from sheep rumen was washed twice with saline solution and the solution was added to the ruminal fluid before isolation of LAB in order to resemble the operation procedure used in the fermenters,

Several molecular techniques can be used to analyze the diversity of rumen microbial populations, and all of them have assumptions or limitations that must be



considered relative to their advantages (Firkins and Yu, 2006). The ARISA technique analysis was selected for the study because it is a rapid and effective method for assessing microbial community diversity (Fisher and Triplett, 1999), and it allows a fast analysis of a large number of samples. Although ARISA cannot provide specific taxonomic identification of individual peaks detected in the electropherograms, it is considered to be more sensitive than other fingerprinting methods, such as DGGE or SSCP (Danovaro et al., 2006), and to be well suited to detect subtle changes in ruminal bacterial community composition (Welkie et al., 2009). The ARISA approach has been recently used to monitor shifts in ruminal bacteria (Welkie et al., 2009) and fungi (Denman et al., 2008), and to analyze the representativeness of SAB pellets isolated from ruminal digesta (Ramos et al., 2009).

A total of 170 peaks were detected in the ARISA electropherograms of bacterial pellets across the full set of 64 samples, from which 160 were detected in at least 1 individual from each system (sheep or fermenter). The number of peaks in bacterial pellets isolated from sheep rumen ranged from 42 to 82 for LAB and from 31 to 81 for SAB, with a total of 168 peaks. In Rusitec fermenters, the number of peaks ranged from 53 to 79 for LAB and from 21 to 69 for SAB, with 162 peaks in total. In the bacterial pellets from sheep, there were 8 peaks (4.8% of detected) only found in LAB and 6 (3.6% of detected) only in SAB. In a study using ARISA to analyze the ruminal bacterial community in 2 lactating cows fed a 65% forage diet, Welkie et al. (2009) observed that 13.5% of the peaks were detected only in the liquid phase, and only 1.9% were detected only in the solid phase. In the Rusitec system, 30 peaks (18.5% of detected) were only found in LAB and 8 (4.9%) were unique to SAB.

Kocherginskaya et al. (2001) hypothesized a priori that diversity would be greater for HF than for mixed grain/forage diets, although subsequent diversity index did not support this hypothesis in their study and corn-fed steers displayed more diverse and rich bacterial populations than hay fed steers. In our study (Table 4.6.3.), no effect of F:C ratio was detected either in the number of peaks or in the Shannon index in LAB isolated from sheep ( $P = 0.39$  and  $0.23$ , respectively) or fermenters ( $P = 0.83$  and  $0.29$ ). In contrast, the number of peaks and the Shannon index were greater in SAB isolated from sheep fed HF diets than from those fed HC diets ( $P = 0.03$  and  $0.05$ , respectively), although no effect of F:C ratio was detected in SAB isolated from fermenters ( $P = 0.41$  and  $0.50$ ). The greater diversity in SAB from sheep fed HF diets is in accordance with the results of Laure et al. (2004), who analyzed the bacteria in solid rumen content taken

from sheep fed diets containing orchardgrass hay or hay plus 30% concentrate, and observed that bacterial diversity tended to be greater in sheep fed only hay compared with those fed hay plus concentrate.

The SAB isolated from sheep or fermenters receiving G diets had greater number of peaks and Shannon index values than those isolated when A diets were fed ( $P < 0.001$  to  $0.004$ ). Greater numbers of peaks and Shannon index for G diets compared with A diets were also observed for LAB pellets isolated from fermenters ( $P = 0.005$  and  $0.004$ ), but no effect ( $P = 0.65$  and  $0.54$ ) of type of forage on LAB profile was found in sheep. No interaction ( $P = 0.41$  to  $0.82$ ) F:C x FOR was observed for any variable. The results indicate that bacterial diversity in the rumen was more markedly affected by type of forage than by F:C ratio in the diet. This is in agreement with the results of Koike et al. (2003), who observed that the set of bacteria isolated from orchardgrass seemed to be different from the set isolated from alfalfa when samples of both forages were incubated in sacco in the rumen of sheep, and bacterial 16S rDNAs were cloned. These authors concluded that the hay source may affect the members of fiber-associated rumen bacterial community (e.g. sequences sharing 90-96% similarity with *Treponema bryantii* were frequently seen in the library from alfalfa, but not at all in the library from orchardgrass).

In paired *t* tests within each fermentation system (*in vivo* or *in vitro*), there was no difference between LAB and SAB from sheep either in the number of peaks ( $P = 0.74$ ; 62.6 vs. 60.9) or in the Shannon index ( $P = 0.89$ ; 4.11 vs. 4.07). In contrast, in Rusitec fermenters LAB had greater number of peaks ( $P < 0.001$ ; 65.9 vs. 47.6) and values of Shannon index ( $P = 0.001$ ; 4.17 vs. 3.76) compared with SAB, indicating a greater bacterial diversity in the bacterial pellets isolated from the liquid phase compared with those isolated from the solid digesta. It must be noticed that whereas LAB are relatively easy to isolate, and a great recovery of the bacteria populations should be expected when isolating LAB pellets. In contrast, recovery of SAB from ruminal digesta is usually lower than 50%, indicating that a pure SAB isolate may not be representative of the total SAB population. In previous studies conducted at our laboratory, the treatment of ruminal digesta with the methylcellulose solution used in the present work resulted in the recovery of 58.9 and 44.8% of total SAB for forage and concentrate, respectively, incubated in Rusitec fermenters (Martínez et al., 2009), whereas the recovery from

**Table 4.6.3.** Values of Shannon index and numbers of peaks detected in the ARISA electropherograms of liquid-associated (LAB) and solid-associated (SAB) bacterial pellets isolated from the rumen of sheep and Rusitec fermenters receiving diets differing in forage:concentrate ratio (F:C) and type of forage (FOR) and similarity index of ARISA profiles between LAB and SAB pellets.

Item	FS	Diet <sup>1</sup>				SEM	Significance of effects ( <i>P</i> = )		
		HFA	HFG	HCA	HCG		F:C	FOR	F:C x FOR
Number of peaks									
LAB	Rumen	65.0	63.8	62.0	59.5	3.80	0.39	0.65	0.86
	Fermenters	58.3 <sup>a</sup>	73.0 <sup>b</sup>	61.8 <sup>a</sup>	70.5 <sup>b</sup>	1.76	0.83	0.005	0.46
SAB	Rumen	54.5 <sup>ab</sup>	77.5 <sup>c</sup>	48.5 <sup>a</sup>	63.0 <sup>b</sup>	3.57	0.03	0.002	0.28
	Fermenters	27.8 <sup>a</sup>	64.5 <sup>b</sup>	34.3 <sup>a</sup>	63.8 <sup>b</sup>	3.17	0.41	< 0.001	0.32
Shannon index									
LAB	Rumen	4.17	4.13	4.09	4.05	0.063	0.23	0.54	0.96
	Fermenters	4.05 <sup>a</sup>	4.26 <sup>b</sup>	4.12 <sup>a</sup>	4.25 <sup>b</sup>	0.022	0.29	0.004	0.83
SAB	Rumen	3.95 <sup>a</sup>	4.34 <sup>b</sup>	3.88 <sup>a</sup>	4.12 <sup>b</sup>	0.071	0.05	0.004	0.29
	Fermenters	3.28 <sup>a</sup>	4.17 <sup>b</sup>	3.44 <sup>a</sup>	4.15 <sup>b</sup>	0.093	0.50	0.001	0.41
Similarity index, %									
	Rumen	56.5	50.7	51.7	54.1	5.46	0.90	0.76	0.48
	Fermenters	49.3 <sup>a</sup>	78.1 <sup>b</sup>	53.2 <sup>a</sup>	80.4 <sup>b</sup>	3.43	0.39	< 0.001	0.82

<sup>a, b, c</sup> Within each row, means with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ; Tukey's test).

<sup>1</sup> HFA: 70:30 alfalfa hay:concentrate; HFG: 70:30 grass hay:concentrate; HCA: 30:70 alfalfa hay:concentrate; HCG: 30:70 grass hay:concentrate. DM basis.

ruminal digesta from sheep was only 36.7 and 29.3 for HF and HC diets, respectively (Ramos et al., 2009). In addition, the similarity index between the bacterial communities in the solid digesta and those in SAB pellets was greater in Rusitec fermenters (84.0% for forage vs. 86.4% for concentrate) than in sheep (52.2 and 56.0% for HF and HC diets, respectively). These data indicate that recovery and representativeness of SAB from sheep digesta are lower compared with Rusitec fermenters. This may help to explain the lack of differences in diversity between LAB and SAB in sheep, whereas in Rusitec LAB had greater diversity than SAB.

There was a significant relationship ( $r = 0.734$ ;  $P = 0.001$ ;  $n = 16$ ) between the number of peaks in LAB and that in SAB in Rusitec fermenters, but no significant relationship was found *in vivo* ( $r = 0.098$ ;  $P = 0.72$ ;  $n = 16$ ; results not shown). This would indicate that the effects of diet characteristics on bacterial diversity were similar in LAB and SAB communities in fermenters, but contrasting in sheep. In fermenters, feeding G diets promoted a greater diversity of both LAB and SAB compared with A diets, whereas in sheep LAB diversity was not affected by diet and SAB isolated from animals fed A diets had lower diversity than those from G-fed sheep.

Larue et al. (2005) and Michalet-Doreau et al. (2001) in sheep and Boguhn et al. (2008) in Rusitec fermenters reported differences in the bacterial communities found in the fluid and those in the solid phase of the rumen. Similarity index between LAB and SAB ranged from 37.8 to 74.3% in sheep and from 41.0 to 81.1% in fermenters. Diet characteristics did not affect ( $P = 0.90$  and  $0.76$  for F:C and type of forage, respectively) the index of similarity between LAB and SAB in sheep (Table 4.6.3.), but similarity between the 2 bacterial fractions was greater in fermenters fed G diets compared with those receiving A diets (79.3 vs. 51.3%). Rusitec fermenters showed greater ( $P = 0.001$ ) similarity index between LAB and SAB than sheep (65.3 vs. 53.3%, mean values averaged across diets), although an interaction system x type of forage was observed ( $P < 0.001$ ).

Several studies have pointed out large variations of microbial communities between animals (Mackie et al., 1999; Firkins and Yu, 2006). In our to reduce the inter-animal variability in our study, we decided to use a 4 x 4 Latin square design and fed all experimental diets to each sheep. Significant effects of sheep were found on numbers of peaks and Shannon index of LAB ( $P = 0.008$  and  $0.005$ , respectively) and SAB ( $P = 0.02$  and  $0.02$ ), confirming previous observations. In contrast, no effect ( $P = 0.11$  to  $0.26$ ) of fermenter was detected on the number of peaks or Shannon index in LAB and

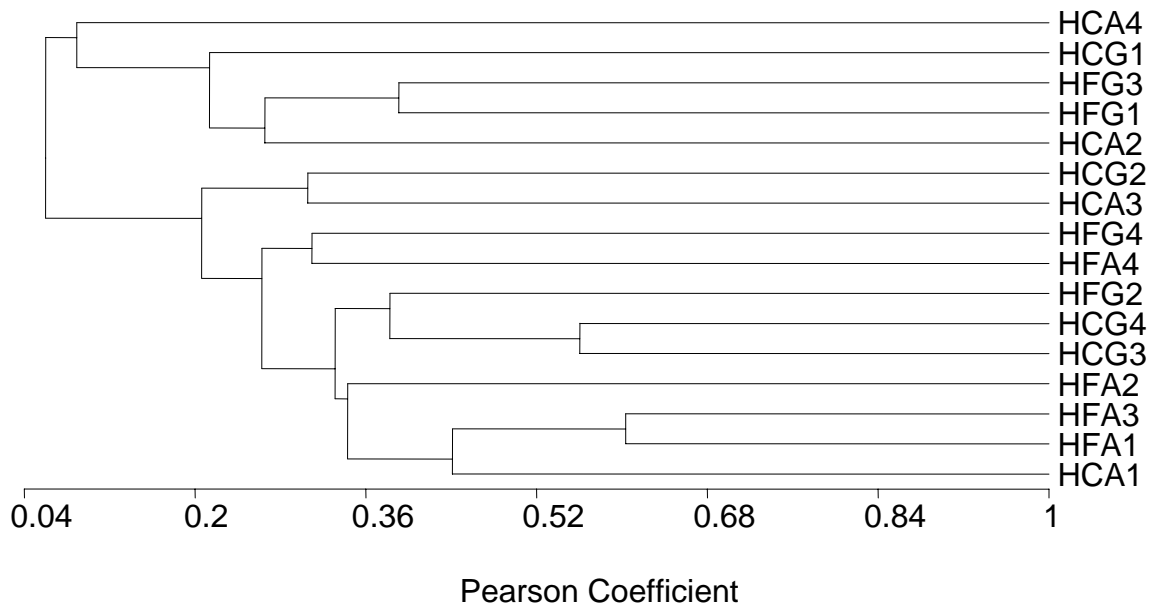
SAB. Microbial communities in the gastrointestinal tract are influenced by numerous external and internal host-related factors (Mackie et al., 1999). The host animal influences microbial population in the rumen through physiological processes (mastication, rumia, feeding behavior, digesta passage rate, etc.) that cannot appropriately be mimicked *in vitro*. In the Rusitec system, operating parameters (input and buffer capacity of artificial saliva, feeding rate, movements, etc.) are identical in all fermenters, and therefore the lack of significant fermenter effects seems to be logical.

Figures 4.6.1. and 4.6.2. show the dendrograms of the ARISA profiles of LAB and SAB bacterial communities in sheep and Rusitec fermenteres, respectively. A different clustering pattern was observed in the 2 systems and in the 2 bacterial fractions. In general, similarity between samples in the same cluster (based on Pearson's correlation coefficient) was higher in Rusitec pellets than in those obtained from the sheep rumen, suggesting a lower variability in the bacterial communities *in vitro*. For LAB pellets isolated from sheep rumen, no clear clustering pattern could be established based on F:C ratio or forage type. The SAB pellets formed two major clusters according to basal forage, with most pellets from sheep fed A diets clustered together and a distinct cluster for the majority of pellets from G-fed sheep.

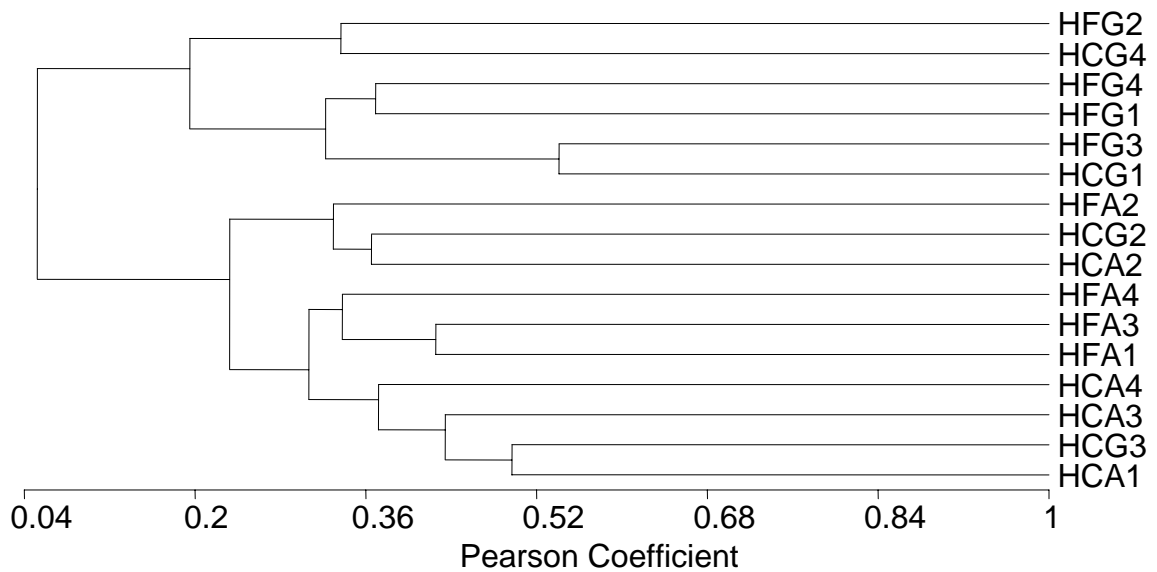
In Rusitec fermenters, LAB pellets clustered first according to F:C ratio and, within HF or HC diet, according to the type of forage. The SAB pellets followed a similar grouping trend to that observed *in vivo*, with all pellets from fermenters fed A diets clustered together and a distinct cluster for all pellets from fermenters receiving G diets. Two clear subclusters according to F:C ratio were observed within each of the 2 main clusters. The results suggest that in both systems SAB communities were mainly affected by the type of forage. The structure of LAB communities depended primarily on F:C ratio in Rusitec fermenters, but in sheep it seems to be more variable and less dependent on the diet fed to the animals.

These results suggest a different structure of the bacterial communities found in the rumen of sheep and in the Rusitec fermenters, which was confirmed by analyzing all samples together by principal component analysis (Figure 4.6.3.). About 33% of the variance between samples was explained by the two main components (24.4% on C1 and 8.8 % on C2), giving an indication of the multiple factors that affect ruminal bacterial community structure. The PCA clearly discriminated between Rusitec and *in vivo* profiles, and two distinct clusters were observed for *in vivo* and *in vitro* samples.

LAB)

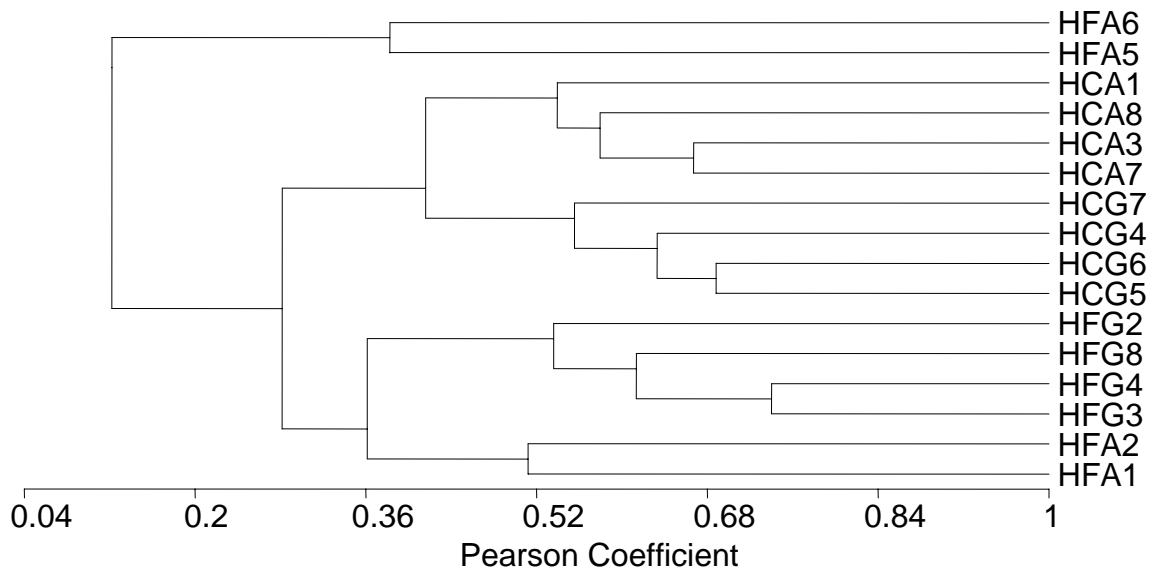


SAB)

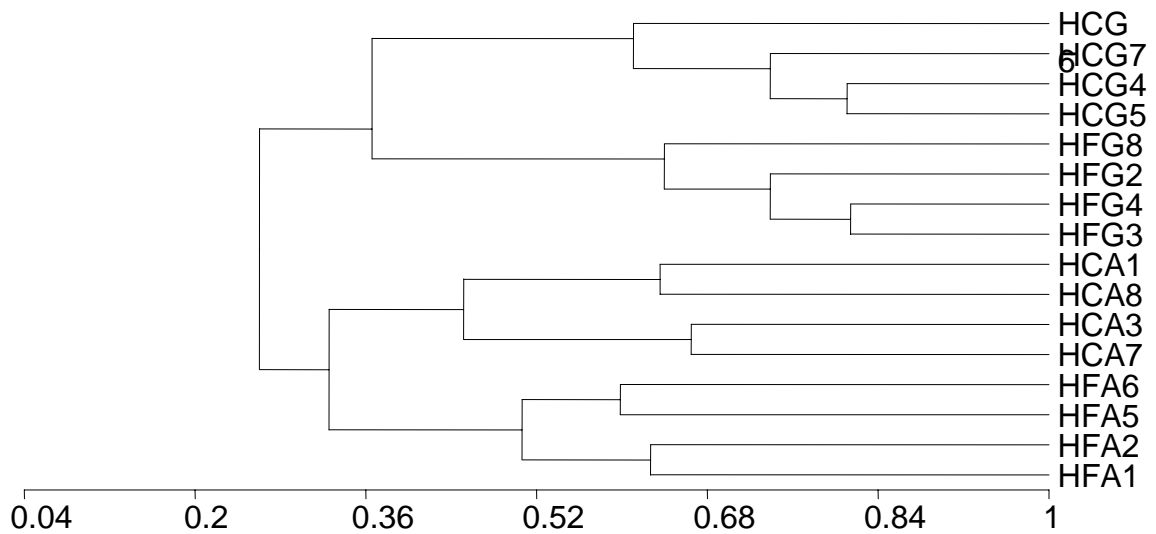


**Figure 4.6.1.** Dendrograms of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) profiles of liquid-associated (LAB) and solid-associated (SAB) bacterial communities in sheep receiving diets with F:C ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage. Numbers 1 to 4 correspond to individual sheep.

LAB)



SAB)

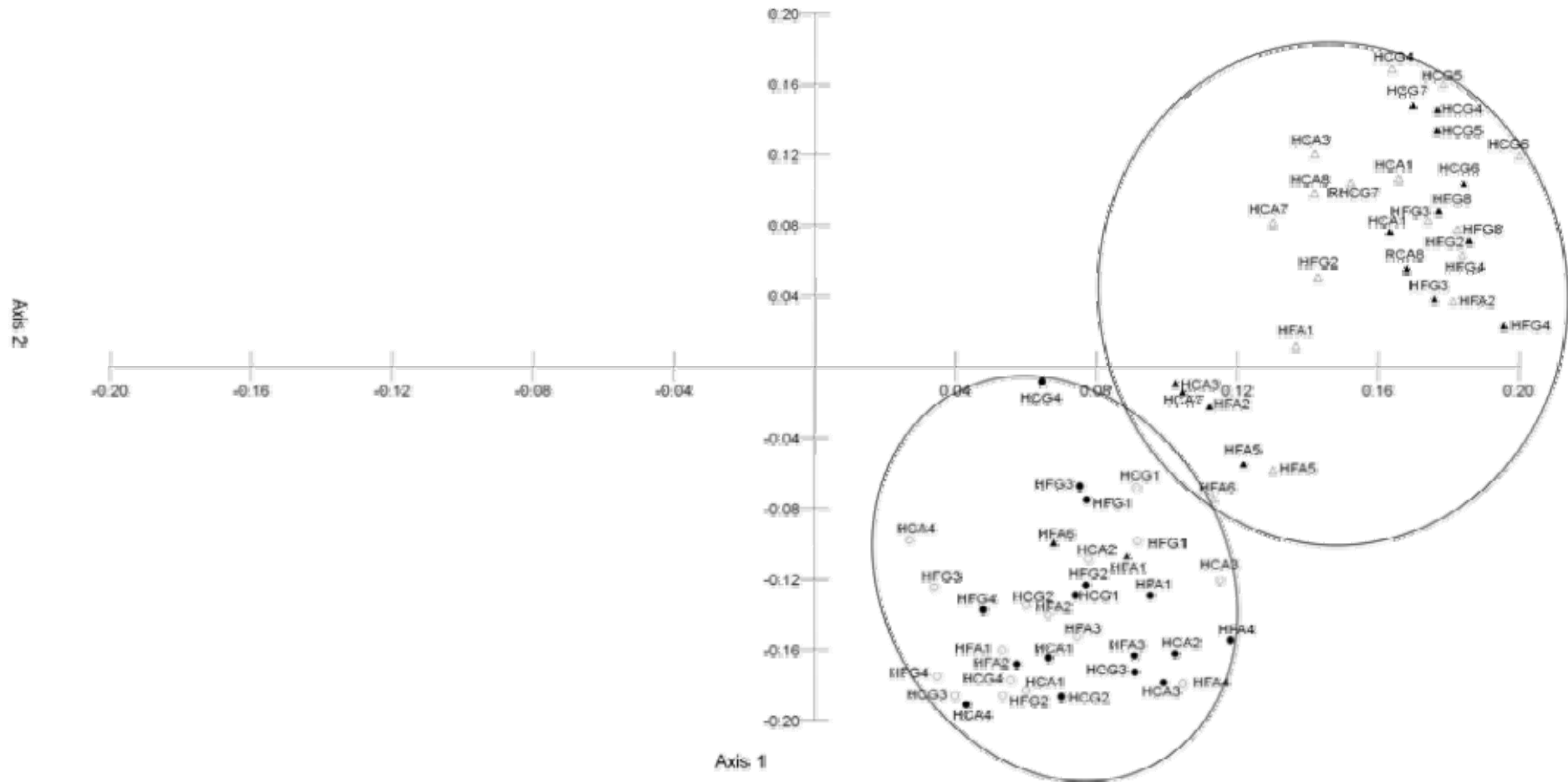


**Figure 4.6.2.** Dendrograms of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) profiles of liquid-associated (LAB) and solid-associated (SAB) bacterial communities in sheep and Rusitec fermenters receiving diets with F:C ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage. Numbers 1 to 8 correspond to individual fermenters.

## CONCLUSIONS

The results of this study confirmed previous observations that Rusitec fermenters do not maintain protozoa numbers at *in vivo* levels, and showed that diversity of protozoa population was not fully representative of that in the rumen of sheep fed the same diets. Cellulolytic numbers were greater in sheep compared with fermenters for all diets, which may be related to operating conditions in Rusitec system. Sheep and fermenters showed relatively similar total bacterial numbers with HF diets, but numbers in fermenters were about 4.9 times greater compared than in sheep when HC diets were fed. Bacterial diversity in SAB pellets was mainly affected by the type of forage in sheep and fermenters, but the structure of LAB communities depended primarily on F:C ratio in Rusitec fermenters and seemed to be independent of the diet in sheep. The different conditions in the fermenters compared with sheep rumen might have caused a selection of some bacterial strains. Studies identifying the changes in bacterial communities through the incubation period in Rusitec fermenters fed diets of different composition are needed to understand the observed differences between *in vivo* and *in vitro* systems.





**Figure 4.6.3.** Principal component analysis generated from ARISA profiles of liquid-associated (LAB; open symbols) and solid-associated (SAB; shaded symbols) bacteria isolated from sheep (circles) or Rusitec fermenters (triangles). Sheep and fermenters received diets with F:C ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage. Numbers 1 to 4 and 1 to 8 correspond to individual sheep and fermenters, respectively.

## REFERENCES

- Abe, M., and Y. Kurihara. 1984 Long-term cultivation of certain rumen protozoa in a continuous fermentation system supplemented with sponge materials. *J. Appl. Bac.* 56:201-203.
- Association of Official Analytical Chemists. AOAC, 1999. Official Methods of Analysis, 16th Edition, 5<sup>th</sup> revision. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Boguhn, J., E. Strobel, M. Witziga, C. C. Tebbe, and M. Rodehutschord. 2008. Description of the structural diversity of rumen microbial communities *in vitro* using single-strand conformation polymorphism profiles. *Arch. Anim. Nutr.* 62: 454–467.
- Brossard, L., C. Martin, and B. Michalet-Doreau. 2003. Ruminal fermentative parameters and blood acid-basic balance changes during the onset and recovery of induced latent acidosis in sheep. *Anim. Res.* 52:513-530.
- Carro, M. D., and E. L. Miller. 2002. Comparison of microbial markers (<sup>15</sup>N and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. *Anim. Sci.* 75:315-321.
- Carro, M. D., P. Lebzien, and K. Rohr. 1995. Effects of pore size of nylon bags and dilution rate parameters in a semi-continuous artificial rumen. *Small Rumin. Res.* 15:113-119.
- Carro, M.D., P. Lebzien and K. Rohr. 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.
- Crawford, Jr. R.J., W. H. Hoover and P. H. Knowlton. 1980. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. I. Dry matter and fiber digestion, VFA production and protozoa numbers. *J. Anim. Sci.* 51:975-985.
- Czerkawski, J. W., and G. Breckenridge. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 38:371-384.
- Danovaro, R., G. M. Luna, A. Dell'Anno, and B. Pietrangeli. 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.* 72:5982-5989.
- Dehority, B. A. 1969. Pectin-fermenting bacteria isolated from the bovine rumen. *J. Bacteriol.* 99:189-196.
- Dehority, B. A. 1993. Laboratory manual for classification and morphology of ruminal ciliate protozoa. CRC Press, Boca Raton, FL.

- Dehority, B. A. 2003. Rumen Microbiology. Nottingham Univ. Press, Nottingham, UK.
- Dehority, B. A., P. A. Tirabasso, and A. P. Grifo, Jr. 1989. Most probable-number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total bacteria and cellulolytic numbers in one medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2789-2792.
- Denman, S.E., Nicholson, M.J., Brookman, J.L., Theodorou, M.K., and McSweeney, C.S. 2008. Detection and monitoring of anaerobic rumen fungi using an ARISA method. *Lett. Appl. Microbiol.* 47:492–499.
- Eadie, J.M. 1962. The development of rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management. *J. Gen. Microbiol.* 29:563-578.
- Firkins, J. L. and Zhu, Z. 2006. Characterisation and quantification of the microbial populations of the rumen. In: Ruminant Physiology. Pages 19-54 in Ruminant, Digestion, Metabolism and Impact on Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress. K. Serjssen, T. Hevelplund and M.O. Nielsen, ed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Neatherlands.
- Fisher, M. M., and E. W. Triplett. 1999. Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. *Appl. Environm. Microbiol.* 65: 4630–4636.
- Franzolin, R., and B. A. Dehority. 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *J. Anim. Sci.* 74:2803-2809.
- Gizzi, G., R. Zanchi, and F. Sciaraffia. 1998. Comparison of microbiological and fermentation parameters obtained with an improved rumen *in vitro* technique with those obtained *in vivo*. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 73:291-305.
- Hristov, A. N., M. Ivan, L. M. Rode, and T. A. McAllister. 2001. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets. *J. Anim. Sci.* 79:515-524.
- Ipharraguerre, I. R., S. M. Reynal, M. Liñeiro, G. A. Broderick, and J. H. Clark. 2007. A comparison of sampling sites, digesta and microbial markers, and microbial references for assessing the postruminal supply of nutrients in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1904–1919.
- Larue, R., Z. Yu, V. A. Parisi, A. R. Egan, and 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.* 74:530-543.
- Leedle J. A. Z., K. Barshun, and R. B. Hespell. 1986. Postprandial trends in estimated ruminal digesta polysaccharides and their relation to changes in bacterial groups and ruminal fluid characteristics, *J. Anim. Sci.* 62:789–803.
- Mackie, R. I., A. Sghir, and H. R. Gaskins. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69:1035S–45S.
- Mackie, R. I., F. M. C. Gilchrist, A. M. Roberts, P. E. Hannah, and H. M. Schwartz. 1978. Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *J. Agric. Sci.* 90:241–254.
- Mansfield, H.R., M. I. Endres, and M. D. Stern. 1995. Comparison of microbial fermentation in the rumen of dairy cows and dual flow continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55:47-66.
- Martin, C., L. Millet, G. Fonty, and B. Michalet-Doreau. 2001. Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community associated with rumen solid digesta. *Reprod. Nutr. Dev.* 41:413–424.
- Martínez, M. E., M. J. Ranilla, S. Ramos, M.L. Tejido, C. Saro, and 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.* 87:2064–2072.
- Martínez, M.E., M. J. Ranilla, M. L. Tejido, C. Saro, and M. D. Carro. 2010. 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.* (Submitted).
- Martínez, M.E., M. J. Ranilla, S. Ramos, M. L. Tejido, and M. D. Carro. 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.* 92:3930–3938.
- Merry, R. J., and A. B. McAllan. 1983. A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta. *Br. J. Nutr.* 50:701-709.
- Michalet-Doreau, B., I. Fernandez, C. Peyron, L. Millet, and G. Fonty. 2001. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod. Nutr. Dev.* 41:187–194.

- Molina-Alcaide, E., A. Moumen, I. Martín García, and M. D. Carro. 2009. Comparison of bacterial pellets and microbial markers for the estimation of the microbial nitrogen and amino acids flows from single flow continuous culture fermenters fed diets containing two-stage olive cake. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 93:527-537.
- Muetzel, S., Lawrence, P., Hoffmann, E. M., and K. Becker. Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 151:32-43.
- Nakamura, F. and Y. Kurihara. 1978. Maintenance of a certain rumen protozoal population in a continuous *in vitro* fermentation system. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:500-506.
- NRC. 1985. *Nutrient Requirements of Sheep*. 6th ed. National Academy Press. Washington DC.
- Ogimoto, K., and S. Imai. 1981. *Atlas of Rumen Microbiology*. Tokyo: Japan Scientific Societies Press.
- Prevot, S., J. Senaud, and G. Prensier. 1994. Variation in the composition of the ruminal bacterial microflora during the adaptation phase in an artificial fermenter (Rusitec). *Zool. Sci.* 11:871-882.
- Ramos, S., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Martínez, M.E., Saro, C., and 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.* 92:5659–5668.
- Ranilla, M. J., and M. D. Carro. 2003. Diet and procedures used to detach particulate-associated microbes from ruminal digesta influence chemical composition of microbes and estimation of microbial growth in Rusitec fermenters. *J. Anim. Sci.* 81:537-544.
- Roger, V., G. Fonty, S. Komisarczuk-Bony, and P. Gouet. 1990. Effects of physicochemical factors on the adhesion to cellulose Avicel of the ruminal bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes*. *Appl. Environment. Microbiol.* 56:3081-3087.
- Santra, A., S. A. Karim, A. S. Mishra, O. H. Chaturvedi, and R. Prasad. 1998. Rumen ciliate protozoa and fiber digestion in sheep and goats. *Small Rum. Res.* 30:13–18.
- Shannon, C. E., and W. Weaver. 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana. 117 pp.

- Slyter, L.L. and P. A. Putnam 1967. *In vivo* vs. *in vitro* continuous culture of ruminal microbial populations. *J. Anim. Sci.* 26:1421-1427.
- Sylvester, J. T., S. K. R. Karnati, B. A. Dehority, M. Morrison, G. L. Smith, N. R. St-Pierre, and J. L. Firkins. 2009. Rumen ciliated protozoa decrease generation time and adjust 18S ribosomal DNA copies to adapt to decreased transfer interval, starvation, and monensin. *J. Dairy Sci.* 92:256–269.
- Teather, R. M., and F. D. Sauer. 1988. A naturally compartmented rumen simulation system for the continuous culture of rumen bacteria and protozoa. *J. Dairy Sci.* 71:666–673.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Welkie, D.G., Stevenson, D.M., and Weimer, P.J. 2009. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe*. doi:10.1016/j.anaerobe.2009.07.002.
- Yu, Z., and M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Bio. Techniques* 36:808-812.
- Ziemer, C. J., R. Sharp, M. D. Stern, M. A. Cotta, T. R. Whitehead, and D. A. Stahl. 2000. Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S ribosomal RNA-targeted probes. *Environ. Microbiol.* 1:632–643.

#### ***4.7. Prueba 7***

*The effect of the diet fed to donor sheep on  
in vitro methane production and ruminal  
fermentation of diets of variable composition*





**The effect of the diet fed to donor sheep on *in vitro* methane production and ruminal fermentation of diets of variable composition**

**M.E. Martínez, M.J. Ranilla, M.L. Tejido, C. Saro and  
M.D. Carro**

*Departamento de Producción Animal, Universidad de León,  
24071 León (Spain)  
Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas  
s/n. 24346 Grulleros, León (Spain)*

***Animal Feed Science and Technology (en evaluación)***



## ABSTRACT

Six rumen-fistulated sheep were fed 4 diets in a partially replicated 4 x 4 Latin square design to study the effects of two forage:concentrate (F:C) ratios and two types of forage (FOR) in the diet on *in vitro* methane production and microbial fermentation of the same 4 diets. The diets consisted on either 70:30 (HF) or 30:70 (HC) F:C, and two FOR (alfalfa hay (A) and grass (G) hay), and were designated as HFA, HCA, HFG and HCG. In each period, ruminal fluid from each sheep was used to inoculate batch cultures containing 400 mg DM of each diet. Cultures were incubated at 39°C for 24 h and the main ruminal fermentation parameters were determined. There were no F:C x FOR interactions ( $P>0.05$ ) for any measured variable. Methane production after 8 h was not affected ( $P>0.05$ ) by F:C ratio in the diet, but after 24 h of incubation the amount of methane was 1.2 times greater ( $P<0.05$ ) with HC than with HF inoculum. Total volatile fatty acid (VFA) production was 10.4 and 10.0% greater for HC compared with HF inoculum when HF and HC substrates were incubated, respectively. Changing the F:C ratio in the diet did not affect ( $P>0.05$ ) propionate production for any substrate, but production of butyrate was augmented ( $P<0.01$ ) as F:C ratio in the diet increased. Methane:VFA ratio and apparent dry matter digestibility were not affected ( $P>0.05$ ) by F:C ratio in the diet. For all substrates, diets including A promoted greater ( $P<0.05$ ) methane production after 8 and 24 h, greater ( $P>0.05$ ) production of total and individual VFA, as well as greater ( $P<0.01$ ) acetate:propionate ratios,  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentrations and apparent dry matter digestibility compared with G diets. Whereas FOR in the diet of donor animals did not affect ( $P>0.05$ ) methane:VFA ratio when HF substrates were incubated, for HC substrates methane:VFA ratio was greater ( $P<0.05$ ) with inoculum from sheep fed A diets. There were clear differences in methane production among inocula from different sheep, which persisted across diets and substrates. The results indicate that methane production *in vitro* is affected by both F:C ratio and type of forage in the diet of donors, and these variables should be taken into account when conducting *in vitro* experiments.

**Key words:** methane, *in vitro* ruminal fermentation, forage:concentrate ratio, forage, sheep

## INTRODUCTION

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 for studying ruminal fermentation. Although different types of artificial rumen apparatus are routinely used in many laboratories, in the last years there has been an increased use of batch cultures of ruminal microorganisms (BCRM). The BCRM have been used for investigating the effects of additives on ruminal fermentation (Busquet et al., 2005; Carro et al., 2005; Giraldo et al., 2008), nutritive evaluation (López et al., 1998) and comparing fermentative activity of different animal species (Hervás et al., 2005), among other purposes. Although BCRM are a rapid and precise method that only needs a small amount of substrate, they still require an inoculum to create the fermentative environment and the microbial populations in the ruminal fluid can affect the *in vitro* fermentation of the incubated substrate (Mould et al., 2005). Ruminal microbial populations are affected by a wide range of factors, but the diet fed to the host animals is one of the most relevant. Several studies have indicated that the diet of donor animals influences gas production (Menke and Steingass, 1988; Nagadi et al., 2000) and substrate degradability (Nagadi et al., 2000; Tejido et al., 2002). We are not aware, however, of studies that have investigated the effect of the diet of donors on *in vitro* methane production.

Methane is one of the major end products of anaerobic fermentation of feeds in the rumen. Reducing methane production is an important goal of ruminant nutritionists as it represents a significant loss of energy for the host animal and contributes to global warming (Moss et al., 2000). Many attempts have been made to depress rumen methanogenesis through the use of feed additives or diet modifications, and the number of studies using BCRM has noticeably increased in the last years as *in vivo* determination of methane emission is laborious, time-consuming and requires complex and expensive equipment. Methane production *in vivo* has been reported to be close to that measured *in vitro* in some studies (Getachew et al., 2005; Bhatta et al., 2008), but the relationship between both values has been shown to be poor in another study (Moss and Givens, 1997). Methane production is affected by many factors, such as the type of diet and the rumen pH; thus, fewer methanogens have been detected in the rumen of concentrate-fed animals than in the rumen of forage-fed ones (Demeyer and Fievez,

2000). We hypothesized that the diet fed to donor animals could affect *in vitro* methane production. The objective of this study was therefore to examine the effect of varying the forage to concentrate ratio (F:C) and the quality of forage (FOR) in the diet of donors on *in vitro* methane production and fermentation of diets of variable composition in BCRM.

## MATERIALS AND METHODS

### *Diets*

Four total mixed diets were formulated according to a 2 × 2 factorial arrangement of treatments. The diets had F:C (dry matter (DM) basis) ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) with either alfalfa hay (A) or grass hay (G) as FOR, and were designated as HFA, HCA, HFG and HCG, respectively. Ingredients and chemical composition of diets are shown in Table 4.7.1. The alfalfa hay was a second-cut harvested at 30% flowering and contained 91.3% DM, 2.67% N, 46.6% neutral-detergent fibre (aNDF), and 33.1% acid-detergent fibre (ADF; DM basis). The grass hay consisted primarily of perennial ryegrass (81%), red and white clover (11%), and other grasses (8%), was harvested at post-flowering stage, and contained 93.3% DM, 1.46% N, 56.9% aNDF, and 28.6% ADF (DM basis). The concentrate contained 91.4% DM, 3.04% N, 33.5% aNDF, and 12.5% ADF (DM basis).

### *Animals and inocula*

Six ruminally and duodenally cannulated Merino sheep ( $59.0 \pm 4.5$  kg body weight (BW)) were used in a partially replicated 4 x 4 Latin square with 4 dietary treatments and 4 15-day periods. Sheep were cared and handled in accordance with the Spanish Animal Care Regulations, and the experimental protocols were approved by the León University Institutional Animal Care and Use Committee. Sheep were housed in individual pens and had continuous access to fresh water and vitamin/mineral block over the experimental period. Diets were offered to the animals twice daily (8.00 and 20.00 h) at a daily rate of 56 g DM/kg BW<sup>0.75</sup> to minimize feed selection. This level of intake was estimated to meet 1.2, 1.1, 1.4 and 1.3 times the energy maintenance requirements of the experimental sheep for HFA, HFG, HCA and HCG diets, respectively (NRC, 1985).

**Table 4.7.1.** Ingredients and chemical composition of the 4 experimental diets with F:C ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage.

Item	HFA	HFG	HCA	HCG
Ingredient, % of DM				
Alfalfa hay	70	-	30	-
Grass hay	-	70	-	30
Barley	6.4	6.4	15.2	15.2
Gluten feed	6.1	6.1	14.5	14.5
Wheat middlings	5.7	5.7	13.7	13.7
Soybean meal	4.1	4.1	9.7	9.7
Palmkern meal	3.8	3.8	9.0	9.0
Wheat	1.5	1.5	3.5	3.5
Corn	1.5	1.5	3.5	3.5
Vitamin-Mineral premix <sup>1</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0
Chemical composition				
DM, %	92.7	92.5	92.5	92.4
OM, % of DM	91.3	92.7	91.3	91.9
N, % of DM	2.69	1.94	2.83	2.56
aNDF, % of DM	42.6	49.9	37.4	40.1
ADF, % of DM	26.9	23.8	18.7	17.4
ME, <sup>2</sup> Mcal/kg of DM	2.12	2.00	2.45	2.39

<sup>1</sup> Vitamin-mineral premix contained per kilogram of DM: 11,250 IU of vitamin A; 2,250 IU of vitamin D<sub>3</sub>; 25 mg of Vitamin E; and 10 mg of CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O.

<sup>2</sup> Estimated according to the NRC (1985).

On day 15 of each period, about 500 g of ruminal contents were taken through the cannula of each sheep immediately before the morning feeding and strained through 4 layers of cheesecloth into an Erlenmeyer flask with an O<sub>2</sub>-free headspace. The pH of the fluid was immediately measured, 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 0.5 M HCl for NH<sub>3</sub>-N determination, 5 mL were frozen at -20°C for total lactate analyses, 5 mL were added to 5 mL of methylgreen-formalin solution (Ogimoto and Imai, 1981) and stored at room temperature in the dark until protozoa counting, and 5 mL were immediately frozen at -80°C for determination of carboxymethylcellulase, xylanase, and amylase activities. The rest of the ruminal fluid was used for the *in vitro* incubations.

#### ***In vitro fermentation of substrates***

Samples of each diet (400 mg) were weighed into 120-mL serum bottles. Ruminal fluid from each sheep 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 CO<sub>2</sub>. Forty mL of buffered rumen fluid were added into each bottle under CO<sub>2</sub> flushing. Bottles were sealed with rubber stoppers and aluminium caps and incubated at 39°C for 24 h.

A total of 48 bottles (two bottles for each substrate and inoculum) were incubated in each period. After 8 h of incubation gas production was measured in each bottle using a pressure transducer and a calibrated syringe, a gas sample (about 15 mL) was removed and stored in a Haemoguard Vacutainer (Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium) for methane analysis, and the gas produced was vented to prevent its accumulation. After 24 h, gas production was measured and a sample was taken for analysis of methane. Bottles were uncapped, the pH was measured immediately with a pH meter, and the fermentation was stopped by swirling the bottles in ice. Samples of bottle's fluid were taken for VFA, ammonia-N and lactate analysis as described before. Finally, contents of the 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, weighed and the residue was analysed for aNDF to calculate true DM degradability (TDMD; Van Soest et al., 1966) and aNDF degradability (aNDFD).

### ***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). aNDF and ADF analyses were carried out according to Van Soest et al. (1991) using an ANKOM<sup>220</sup> Fibre Analyzer unit (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA). Sodium sulphite and heat-stable amylase were used in analysis of aNDF and ADF, and they were expressed inclusive of residual ash. Analyses of VFA, ammonia-N and lactate have been described by Carro and Miller (1999).

Protozoa in preserved ruminal fluid samples were counted in duplicate from 10 microscopic fields using a Hausser Nageotte Bright-line counting chamber (0.5 mm depth; Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) at a magnification of 20X-100X. Family Isotrichidae and Family Ophryoscolecidae (including subfamilies Entodiniinae, Diplodiniinae, and Ophryoscolecinae) were identified following descriptions by Dehority (1993), and their numbers were separately recorded. Duplicate preparations of

each sample were counted, and, if either value differed from the average by more than 10%, the counts were repeated.

For determination of enzymatic activities in ruminal fluid samples, cells were lysed using a Mini-Beadbeater (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) to release intracellular enzymes. Cell material was removed by centrifugation (10,000 x g, 10 min, 4°C) and the supernatant was used for analyses. Carboxymethylcellulase (EC 3.2.1.4.), xylanase (EC 3.2.1.8.), and amylase (EC 3.2.1.1.) activities were determined as described by Giraldo et al. (2008) using carboxymethylcellulose, oat spelt xylan, and soluble starch, respectively, as substrates. Enzymatic activities were expressed as  $\mu\text{mol}$  of glucose or xylose released from the corresponding substrates by 1 mL of ruminal fluid in 1 min at 39°C and pH 6.5.

### ***Calculations and statistical analyses***

The amounts of VFA produced in each culture 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 (mL) was corrected for temperature (273 K) and pressure ( $1.013 \times 10^5$  Pa) and the volume of gas produced was measured using a pressure transducer. The amount of methane ( $\mu\text{mol}$ ) was calculated by multiplying gas produced ( $\mu\text{mol}$ ) by the concentration of methane in the analyzed sample. The total amount of methane produced was calculated as the sum of that produced at 8 h of incubation and that produced from 8 to 24 h. Production of methane after 24 h of incubation was also estimated stoichiometrically in each BCRM from VFA proportions according to Demeyer (1991). Recovery of hydrogen was estimated from net productions of acetate, propionate, butyrate, valerate and methane (Demeyer, 1991).

Data on inoculum characteristics were analyzed as a mixed model using the PROC MIXED of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). The effects F:C, FOR, F:C x FOR and period were considered fixed, and sheep effect was considered random. *In vitro* fermentation data were analyzed independently for each incubated substrate using the model described for the *in vivo* data. The mean values of the two bottles incubated for each substrate and inoculum were used for the statistical analyses (6 values per treatment). Effects were declared significant at  $P < 0.05$ , and  $P < 0.10$  was considered a



trend and discussed. When a significant effect of treatment ( $P<0.05$ ) was detected, differences among means were tested using the Tukey's multiple comparison test.

## RESULTS

### *Inocula characteristics*

There were differences between the fermentation characteristics of the four inocula (HFA, HFG, HCA and HCG) used in this experiment (Table 4.7.2-). No F:C x FOR interactions ( $P=0.100$  to  $0.976$ ) were detected for any parameter, with the exception of molar proportion of valerate ( $P = 0.025$ ). The inoculum from sheep fed HF-diets had higher ( $P<0.001$ ) pH and acetate proportions, and lower ( $P\leq 0.001$ ) concentrations of lactate and  $\text{NH}_3\text{-N}$  and proportions of butyrate compared with inoculum from sheep receiving HC diets. Total protozoa numbers tended ( $P=0.098$ ) to be higher for HF than for HC diets, but there were no differences ( $P=0.124$  to  $0.355$ ) in Isotrichidae, Entodiniinae or Diplodiniinae numbers due to F:C ratio in the diet. Ruminal fluid from sheep fed A diets had higher concentrations of lactate ( $P=0.045$ ) and  $\text{NH}_3\text{-N}$  ( $P=0.001$ ), molar proportions of butyrate, isobutyrate and isovalerate, and total protozoa numbers ( $P=0.028$ ) compared with fluid from sheep receiving G diets. Carboxymethylcellulase, xylanase and amylase activities were greater ( $P<0.001$ ) for HC inoculum compared with HF, but FOR in the diet only affected carboxymethylcellulase activity, which was greater ( $P=0.020$ ) in fluid from sheep fed A diets.

### 3.2. Effects of F:C ratio in the diet of donor sheep

The effects of the diet of donor sheep on the *in vitro* fermentation of HFA, HFG, FCA and HCG substrates are shown in Tables 4.7.3., 4.7.4., 4.7.5. and 4.7.6., respectively. There were no F:C x FOR interactions ( $P=0.105$  to  $0.995$ ) for any measured variable. Decreasing the F:C ratio in the diet of donor sheep reduced final pH when HFA ( $P=0.017$ ) and HCG ( $P=0.007$ ) substrates were incubated, and tended ( $P<0.10$ ) to reduce it with HCA and HFG substrates. Gas production after 8 and 24 h of incubation was greater ( $P<0.001$  to  $0.042$ ) with HC inoculum compared with HF inoculum for all substrates. Methane production after 8 h was not affected ( $P=0.202$  and  $0.692$ ) by F:C ratio in the diet, but after 24 h of incubation the amount of methane was 1.2 times higher with HC than with HF inoculum ( $P=0.002$  to  $0.014$ ).

**Table 4.7.2.** Ruminal pH, concentrations of NH<sub>3</sub>-N, lactate and total VFA, molar proportions of VFA, protozoa numbers and enzymatic activities in rumen fluid used as inoculum for the *in vitro* incubations

Item	Diet <sup>1</sup>				SEM	Significance of effects (P = ) <sup>2</sup>		
	HFA	HFG	HCA	HCG		F:C	FOR	F:C x FOR
pH	6.98 <sup>b</sup>	6.86 <sup>b</sup>	6.56 <sup>a</sup>	6.41 <sup>a</sup>	0.086	<0.001	0.149	0.890
Lactate, mg/L	28.3 <sup>a</sup>	26.7 <sup>a</sup>	45.0 <sup>c</sup>	39.1 <sup>b</sup>	1.68	<0.001	0.045	0.225
NH <sub>3</sub> -N, mg/L	148 <sup>b</sup>	115 <sup>a</sup>	177 <sup>c</sup>	158 <sup>b</sup>	6.0	0.001	0.001	0.278
Total VFA, mM	94.8	91.8	93.3	91.0	5.03	0.677	0.588	0.976
VFA, mol/100 mol								
Acetate	65.5 <sup>b</sup>	68.5 <sup>c</sup>	61.8 <sup>a</sup>	64.7 <sup>b</sup>	0.72	<0.001	0.001	0.923
Propionate	15.1	16.4	15.6	17.7	1.03	0.428	0.124	0.704
Butyrate	13.3 <sup>b</sup>	11.3 <sup>a</sup>	16.7 <sup>c</sup>	12.9 <sup>b</sup>	0.58	<0.001	<0.001	0.146
Isobutyrate	1.82 <sup>c</sup>	1.03 <sup>a</sup>	1.77 <sup>bc</sup>	1.28 <sup>a</sup>	0.120	0.190	<0.001	0.230
Isovalerate	2.38 <sup>b</sup>	1.29 <sup>a</sup>	2.20 <sup>b</sup>	1.41 <sup>a</sup>	0.146	0.764	<0.001	0.323
Valerate	1.63 <sup>b</sup>	1.08 <sup>a</sup>	1.52 <sup>ab</sup>	1.65 <sup>b</sup>	0.133	0.263	0.137	0.025
Caproate	0.30 <sup>a</sup>	0.38 <sup>ab</sup>	0.46 <sup>b</sup>	0.41 <sup>ab</sup>	0.036	0.032	0.684	0.100
Acetate/propionate, mol/mol	4.56	4.21	4.07	4.00	0.301	0.193	0.502	0.654
Total protozoa, x 10 <sup>4</sup> /mL	94.3 <sup>ab</sup>	80.0 <sup>a</sup>	129 <sup>b</sup>	90.8 <sup>a</sup>	10.50	0.098	0.028	0.277
Isotrichidae, x 10 <sup>4</sup> /mL	4.91	4.73	4.86	5.30	0.886	0.355	0.931	0.861
Entodiniinae, x 10 <sup>4</sup> /mL	85.7 <sup>ab</sup>	72.0 <sup>a</sup>	117.6 <sup>b</sup>	79.3 <sup>a</sup>	9.61	0.124	0.023	0.262
Diplodiniinae, x 10 <sup>4</sup> /mL	3.72	3.31	6.35	5.57	0.948	0.183	0.540	0.849
Enzymatic activities <sup>3</sup>								
Carboxymethylcellulase	0.76 <sup>a</sup>	0.69 <sup>a</sup>	1.42 <sup>c</sup>	1.04 <sup>b</sup>	0.075	<0.001	0.020	0.110
Xylanase	6.67 <sup>a</sup>	6.54 <sup>a</sup>	11.4 <sup>b</sup>	10.1 <sup>b</sup>	0.845	<0.001	0.291	0.354
Amylase	2.17 <sup>a</sup>	1.87 <sup>a</sup>	6.54 <sup>b</sup>	5.17 <sup>b</sup>	0.582	<0.001	0.857	0.761

<sup>a, b, c</sup> Within each row, means with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ; Tukey's test).

<sup>1</sup> HFA: 70:30 alfalfa hay:concentrate; HFG: 70:30 grass hay:concentrate; HCA: 30:70 alfalfa hay:concentrate; HCG: 30:70 grass hay:concentrate. DM basis.

<sup>2</sup> F:C: forage:concentrate ratio; FOR: forage in the diet.

<sup>3</sup> Carboxymethylcellulase and amylase activities are expressed as  $\mu\text{mol}$  of glucose released from carboxymethylcellulose and soluble starch, respectively, by 1 mL of ruminal fluid in 1 min at 39°C and pH 6.5. Xylanase activity is expressed as  $\mu\text{mol}$  of xylose liberated from oat spelt xylan by 1 mL of ruminal fluid in 1 min at 39°C and pH 6.5.

**Table 4.7.3.** Influence of the diet fed to donor sheep (HFA, HFG, HCA and HCG) on *in vitro* fermentation of a 70:30 alfalfa hay:concentrate diet (HFA; 400 mg) incubated with buffered ruminal fluid for 24 h

Item	Diet <sup>1</sup>				SEM	Significance of effects (P = ) <sup>2</sup>		
	HFA	HFG	HCA	HCG		F:C	FOR	F:C x FOR
pH	6.76 <sup>ab</sup>	6.77 <sup>b</sup>	6.71 <sup>a</sup>	6.72 <sup>ab</sup>	0.013	0.017	0.485	0.847
Gas, mL								
8 h incubation	56.3 <sup>bc</sup>	47.9 <sup>a</sup>	60.9 <sup>c</sup>	55.0 <sup>b</sup>	1.38	0.016	<0.001	0.394
24 h incubation								
24 h incubation	178 <sup>b</sup>	169 <sup>a</sup>	185 <sup>c</sup>	178 <sup>b</sup>	2.0	0.003	0.001	0.701
Methane, µmol								
8 h incubation	347 <sup>ab</sup>	288 <sup>a</sup>	408 <sup>b</sup>	253 <sup>a</sup>	38.1	0.202	0.005	0.502
24 h incubation								
24 h incubation	645 <sup>b</sup>	562 <sup>a</sup>	753 <sup>c</sup>	654 <sup>b</sup>	29.6	0.005	0.006	0.999
Total VFA, µM	3034 <sup>ab</sup>	2812 <sup>a</sup>	3304 <sup>b</sup>	3059 <sup>ab</sup>	84.1	0.017	0.017	0.890
Acetate, µM	1890 <sup>ab</sup>	1747 <sup>a</sup>	2011 <sup>b</sup>	1866 <sup>ab</sup>	49.9	0.086	0.014	0.992
Propionate, µM	621	650	610	657	20.6	0.673	0.089	0.666
Butyrate, µM	351 <sup>ab</sup>	286 <sup>a</sup>	475 <sup>c</sup>	367 <sup>b</sup>	20.9	<0.001	0.001	0.312
Others, µM <sup>3</sup>	171 <sup>b</sup>	128 <sup>a</sup>	208 <sup>c</sup>	168 <sup>b</sup>	9.1	0.001	<0.001	0.860
Acetate/propionate, mol/mol	3.12 <sup>bc</sup>	2.72 <sup>a</sup>	3.34 <sup>c</sup>	2.92 <sup>ab</sup>	0.098	0.192	0.001	0.894
Methane/VFA, µmol/µmol	0.212	0.203	0.224	0.216	0.008	0.114	0.324	0.948
H recovery, %	81.8	81.4	82.9	83.1	1.51	0.131	0.925	0.849
NH <sub>3</sub> -N, mg/L	316 <sup>b</sup>	242 <sup>a</sup>	447 <sup>c</sup>	316 <sup>b</sup>	17.3	<0.001	<0.001	0.123
Lactate, mg/L	20.8	18.7	18.0	16.0	2.38	0.382	0.578	0.391
Digestibility, g/kg								
Apparent DM digestibility	0.584	0.590	0.561	0.575	0.0112	0.182	0.214	0.447
aNDF digestibility	0.400 <sup>ab</sup>	0.416 <sup>b</sup>	0.348 <sup>a</sup>	0.382 <sup>ab</sup>	0.0143	0.086	0.110	0.551
True DM digestibility	0.744 <sup>ab</sup>	0.751 <sup>b</sup>	0.722 <sup>a</sup>	0.737 <sup>ab</sup>	0.0061	0.087	0.100	0.552

<sup>a, b, c</sup> Within each row, means with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ; Tukey's test).

<sup>1</sup> HFA: 70:30 alfalfa hay:concentrate; HFG: 70:30 grass hay:concentrate; HCA: 30:70 alfalfa hay:concentrate; HCG: 30:70 grass hay:concentrate. DM basis.

<sup>2</sup> F:C: forage:concentrate ratio; FOR: forage in the diet.

<sup>3</sup> calculated as the sum of isobutyrate, isovalerate, valerate and caproate

**Table 4.7.4.** Influence of the diet fed to donor sheep (HFA, HFG, HCA and HCG) on *in vitro* fermentation of a 70:30 grass hay:concentrate diet (HFG; 400 mg) incubated with buffered ruminal fluid for 24 h

Item	Diet <sup>1</sup>				SEM	Significance of effects (P = ) <sup>2</sup>		
	HFA	HFG	HCA	HCG		F:C	FOR	F:C x FOR
pH	6.78	6.80	6.71	6.72	0.026	0.062	0.536	0.999
Gas, mL								
8 h incubation	51.3 <sup>a</sup>	47.5 <sup>a</sup>	59.5 <sup>b</sup>	53.2 <sup>a</sup>	1.45	0.006	0.005	0.422
24 h incubation	170 <sup>ab</sup>	166 <sup>a</sup>	182 <sup>c</sup>	174 <sup>b</sup>	1.8	<0.001	0.005	0.170
Methane, µmol								
8 h incubation	375 <sup>ab</sup>	279 <sup>a</sup>	392 <sup>b</sup>	245 <sup>a</sup>	34.3	0.692	0.004	0.471
24 h incubation	630 <sup>b</sup>	517 <sup>a</sup>	741 <sup>c</sup>	615 <sup>ab</sup>	31.0	0.010	0.002	0.836
Total VFA, µM	2723 <sup>a</sup>	2659 <sup>a</sup>	3172 <sup>b</sup>	2834 <sup>a</sup>	78.5	0.016	0.025	0.106
Acetate, µM	1752 <sup>ab</sup>	1694 <sup>a</sup>	1947 <sup>b</sup>	1748 <sup>a</sup>	48.3	0.109	0.021	0.167
Propionate, µM	540 <sup>a</sup>	605 <sup>b</sup>	576 <sup>ab</sup>	609 <sup>b</sup>	15.1	0.709	0.007	0.291
Butyrate, µM	311 <sup>a</sup>	270 <sup>a</sup>	472 <sup>b</sup>	350 <sup>a</sup>	20.1	<0.001	0.002	0.105
Others, µM <sup>3</sup>	120 <sup>b</sup>	89.5 <sup>a</sup>	176 <sup>c</sup>	127 <sup>b</sup>	9.15	0.002	0.001	0.332
Acetate/propionate, mol/mol	3.33 <sup>b</sup>	2.87 <sup>a</sup>	3.41 <sup>b</sup>	2.93 <sup>a</sup>	0.111	0.473	0.001	0.941
Methane/VFA, µmol/µmol	0.231	0.203	0.229	0.224	0.010	0.216	0.112	0.229
H recovery, %	82.5	77.8	82.8	82.1	2.13	0.177	0.239	0.362
NH <sub>3</sub> -N, mg/L	274 <sup>ab</sup>	209 <sup>a</sup>	427 <sup>c</sup>	302 <sup>b</sup>	22.5	<0.001	0.001	0.210
Lactate, mg/L	19.3 <sup>ab</sup>	16.4 <sup>a</sup>	20.6 <sup>b</sup>	15.8 <sup>a</sup>	1.40	0.905	0.017	0.525
Digestibility, g/kg								
Apparent DM digestibility	0.534 <sup>ab</sup>	0.558 <sup>b</sup>	0.497 <sup>a</sup>	0.534 <sup>ab</sup>	0.0135	0.175	0.041	0.635
aNDF digestibility	0.351	0.378	0.343	0.359	0.0117	0.881	0.090	0.640
True DM digestibility	0.683	0.696	0.680	0.687	0.0057	0.881	0.090	0.636

<sup>a, b, c</sup> Within each row, means with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ; Tukey's test).

<sup>1</sup> HFA: 70:30 alfalfa hay:concentrate; HFG: 70:30 grass hay:concentrate; HCA: 30:70 alfalfa hay:concentrate; HCG: 30:70 grass hay:concentrate. DM basis.

<sup>2</sup> F:C: forage:concentrate ratio; FOR: forage in the diet.

<sup>3</sup> calculated as the sum of isobutyrate, isovalerate, valerate and caproate.

**Table 4.7.5.** Influence of the diet fed to donor sheep (HFA, HFG, HCA and HCG) on *in vitro* fermentation of a 30:70 alfalfa hay:concentrate diet (HCA; 400 mg) incubated with buffered ruminal fluid for 24 h

Item	Diet <sup>1</sup>				SEM	Significance of effects (P = ) <sup>2</sup>		
	HFA	HFG	HCA	HCG		F:C	FOR	F:C x FOR
pH	6.74	6.72	6.61	6.67	0.035	0.074	0.467	0.281
Gas, mL								
8 h incubation	58.0 <sup>b</sup>	53.0 <sup>a</sup>	62.8 <sup>b</sup>	58.9 <sup>ab</sup>	1.43	0.042	0.010	0.692
24 h incubation	183 <sup>b</sup>	176 <sup>a</sup>	191 <sup>c</sup>	183 <sup>b</sup>	1.8	0.003	0.003	0.842
Methane, µmol								
8 h incubation	478 <sup>bc</sup>	369 <sup>a</sup>	520 <sup>b</sup>	337 <sup>ab</sup>	41.1	0.461	0.004	0.393
24 h incubation	746 <sup>b</sup>	624 <sup>a</sup>	869 <sup>c</sup>	724 <sup>b</sup>	33.4	0.014	0.002	0.740
Total VFA, µM	3125 <sup>a</sup>	3033 <sup>a</sup>	3472 <sup>b</sup>	3168 <sup>a</sup>	87.3	0.035	0.042	0.249
Acetate, µM	1885	1841	2044	1872	49.6	0.178	0.052	0.218
Propionate, µM	620 <sup>a</sup>	700 <sup>b</sup>	604 <sup>a</sup>	675 <sup>b</sup>	20.3	0.677	0.003	0.828
Butyrate, µM	440 <sup>b</sup>	357 <sup>a</sup>	601 <sup>c</sup>	449 <sup>b</sup>	26.5	0.002	<0.001	0.222
Others, µM <sup>3</sup>	180 <sup>b</sup>	134 <sup>a</sup>	225 <sup>c</sup>	172 <sup>b</sup>	10.1	0.003	<0.001	0.786
Acetate/propionate, mol/mol	3.10 <sup>b</sup>	2.68 <sup>a</sup>	3.46 <sup>c</sup>	2.88 <sup>ab</sup>	0.092	0.048	<0.001	0.407
Methane/VFA, µmol/µmol	0.241 <sup>b</sup>	0.204 <sup>a</sup>	0.247 <sup>b</sup>	0.235 <sup>b</sup>	0.010	0.143	0.030	0.244
H recovery, %	86.6	82.6	86.4	86.0	1.80	0.336	0.248	0.338
NH <sub>3</sub> -N, mg/L	341 <sup>b</sup>	260 <sup>a</sup>	474 <sup>c</sup>	348 <sup>b</sup>	20.9	<0.001	<0.001	0.297
Lactate, mg/L	19.4	18.3	17.2	16.1	1.63	0.155	0.334	0.776
Digestibility, g/kg								
Apparent DM digestibility	0.634 <sup>b</sup>	0.666 <sup>b</sup>	0.598 <sup>a</sup>	0.634 <sup>b</sup>	0.0115	0.049	0.019	0.898
aNDF digestibility	0.380 <sup>b</sup>	0.419 <sup>b</sup>	0.310 <sup>a</sup>	0.381 <sup>b</sup>	0.0151	0.023	0.003	0.302
True DM digestibility	0.766 <sup>b</sup>	0.783 <sup>b</sup>	0.742 <sup>a</sup>	0.768 <sup>b</sup>	0.0059	0.037	0.003	0.422

<sup>a, b, c</sup> Within each row, means with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ; Tukey's test).

<sup>1</sup> HFA: 70:30 alfalfa hay:concentrate; HFG: 70:30 grass hay:concentrate; HCA: 30:70 alfalfa hay:concentrate; HCG: 30:70 grass hay:concentrate. DM basis.

<sup>2</sup> F:C: forage:concentrate ratio; FOR: forage in the diet.

<sup>3</sup> calculated as the sum of isobutyrate, isovalerate, valerate and caproate.

**Table 4.7.6.** Influence of the diet fed to donor sheep (HFA, HFG, HCA and HCG) on *in vitro* fermentation of a 30:70 grass hay:concentrate diet (HCG; 400 mg) incubated with buffered ruminal fluid for 24 h

Item	Diet <sup>1</sup>				SEM	Significance of effects (P = ) <sup>2</sup>		
	HFA	HFG	HCA	HCG		F:C	FOR	F:C x FOR
pH	6.74 <sup>b</sup>	6.72 <sup>a</sup>	6.67 <sup>a</sup>	6.69 <sup>a</sup>	0.011	0.007	0.766	0.071
Gas, mL								
8 h incubation	55.6 <sup>ab</sup>	51.3 <sup>a</sup>	62.4 <sup>c</sup>	58.6 <sup>b</sup>	1.42	0.007	0.015	0.883
24 h incubation	179 <sup>b</sup>	173 <sup>a</sup>	190 <sup>c</sup>	181 <sup>b</sup>	1.9	0.001	0.002	0.458
Methane, µmol								
8 h incubation	434 <sup>a</sup>	405 <sup>a</sup>	566 <sup>b</sup>	334 <sup>a</sup>	39.2	0.205	0.006	0.024
24 h incubation	719 <sup>b</sup>	605 <sup>a</sup>	909 <sup>c</sup>	667 <sup>ab</sup>	28.1	0.002	<0.001	0.111
Total VFA, µM	2998 <sup>a</sup>	2871 <sup>a</sup>	3455 <sup>b</sup>	3132 <sup>a</sup>	86.7	0.004	0.024	0.280
Acetate, µM	1836 <sup>a</sup>	1762 <sup>a</sup>	2076 <sup>b</sup>	1826 <sup>a</sup>	50.4	0.022	0.007	0.108
Propionate, µM	589 <sup>a</sup>	661 <sup>b</sup>	588 <sup>a</sup>	673 <sup>b</sup>	17.1	0.509	<0.001	0.718
Butyrate, µM	418 <sup>b</sup>	338 <sup>a</sup>	588 <sup>c</sup>	468 <sup>b</sup>	26.2	<0.001	0.002	0.453
Others, µM <sup>3</sup>	155 <sup>b</sup>	110 <sup>a</sup>	202 <sup>c</sup>	165 <sup>b</sup>	11.8	0.002	0.005	0.774
Acetate/propionate, mol/mol	3.18 <sup>b</sup>	2.71 <sup>a</sup>	3.57 <sup>b</sup>	2.81 <sup>a</sup>	0.105	0.092	<0.001	0.203
Methane/VFA, µmol/µmol	0.240 <sup>bc</sup>	0.214 <sup>a</sup>	0.260 <sup>c</sup>	0.220 <sup>ab</sup>	0.007	0.154	0.001	0.376
H recovery, %	85.4	82.8	87.3	83.2	1.74	0.352	0.077	0.678
NH <sub>3</sub> -N, mg/L	313 <sup>b</sup>	242 <sup>a</sup>	442 <sup>c</sup>	374 <sup>b</sup>	21.5	<0.001	0.007	0.953
Lactate, mg/L	14.0	12.9	14.0	13.8	1.21	0.499	0.605	0.721
Digestibility, g/kg								
Apparent DM digestibility	0.619 <sup>b</sup>	0.644 <sup>b</sup>	0.573 <sup>a</sup>	0.621 <sup>b</sup>	0.0085	0.007	0.001	0.198
aNDF digestibility	0.368 <sup>b</sup>	0.395 <sup>b</sup>	0.326 <sup>a</sup>	0.378 <sup>b</sup>	0.0094	0.093	0.001	0.228
True DM digestibility	0.747 <sup>b</sup>	0.758 <sup>b</sup>	0.730 <sup>a</sup>	0.751 <sup>b</sup>	0.0038	0.094	0.001	0.229

<sup>a, b, c</sup> Within each row, means with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ; Tukey's test).

<sup>1</sup> HFA: 70:30 alfalfa hay:concentrate; HFG: 70:30 grass hay:concentrate; HCA: 30:70 alfalfa hay:concentrate; HCG: 30:70 grass hay:concentrate. DM basis.

<sup>2</sup> F:C: forage:concentrate ratio; FOR: forage in the diet.

<sup>3</sup> calculated as the sum of isobutyrate, isovalerate, valerate and caproate.

Total VFA production was affected ( $P=0.004$  to  $0.035$ ) by F:C ratio in the diet, the values being 8.3 and 11.9% greater for HC compared with HF inoculum when substrates containing A and G were incubated, respectively. Changing the F:C ratio in the diet did not affect ( $P=0.509$  to  $0.709$ ) propionate production with any substrate, and acetate production was only affected ( $P=0.022$ ) when HCG was incubated. In contrast, the production of butyrate and other VFA (calculated as the sum of isobutyrate, isovalerate, valerate and caproate) was augmented ( $P<0.001$  to  $0.002$ ) for all substrates by increasing the F:C ratio in the diet of donor sheep. Neither methane:VFA ratios nor calculated hydrogen recoveries were affected by the proportion of forage in the diet ( $P=0.114$  to  $0.352$ ).

For all substrates, increasing the proportion of concentrate in the diet of donor animals resulted in an increase ( $P<0.001$ ) in  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentrations in the BCRM, but lactate concentrations remained unchanged ( $P=0.155$  to  $0.905$ ). Whereas apparent DM digestibility of HF substrates was not affected ( $P=0.182$  and  $0.175$  for HFA and HFG, respectively) by F:C ratio in the sheep diet, values were greater ( $P=0.049$  and  $0.007$ ) for HF than for HC inoculum when HC substrates were incubated.

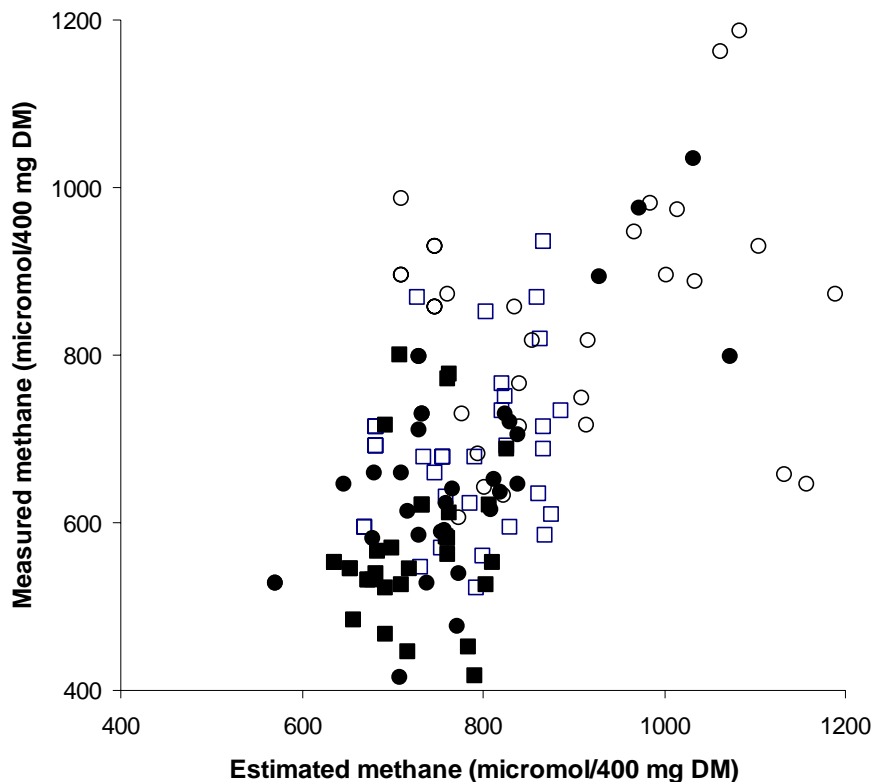
### ***Effects of type of forage in the diet of donor sheep***

The type of forage in the diet of donor sheep significantly affected most of measured parameters, with the exception of final pH ( $P=0.467$  to  $0.766$ ). For all substrates, gas and methane production at 8 and 24 h of incubation was greater ( $P<0.001$  to  $0.015$ ) with inoculum from sheep fed A diets compared with that from sheep fed G diets. Compared with G diets, diets including A promoted greater ( $P<0.001$  to  $0.042$ ) production of total VFA and individual VFA measured in this study, as well as greater ( $P\leq 0.001$ ) acetate:propionate ratios. Whereas FOR in the diet of donor animals did not ( $P=0.112$  to  $0.925$ ) affect either methane:VFA ratio or hydrogen recovery when HF substrates were incubated, with HC substrates methane:VFA ratio was greater with inoculum from sheep fed A diets compared with that from sheep fed G diets ( $P=0.030$  and  $0.001$  for HCA and HCG substrates).

For all substrates, the use of inoculum from sheep fed A diets resulted in greater ( $P<0.001$  to  $0.007$ )  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentrations compared with that from G-fed sheep. In

contrast, lactate concentrations were not affected ( $P=0.334$  to  $0.605$ ) by FOR, with the exception of HFG substrate which showed greater ( $P=0.017$ ) concentrations with HF than with HC inoculum. Compared with inoculum from sheep fed A diets, using ruminal fluid from G-fed sheep produced greater values of apparent DM digestibility for HFG, HCA and HCG substrates ( $P=0.041$ ,  $0.019$  and  $0.001$ , respectively), but no differences among inocula were detected when HFA was incubated ( $P=0.214$ ). Both aNDF and true DM digestibility were greater ( $P<0.05$ ) for G than for A inoculum when HC substrates were incubated, but no differences ( $P>0.05$ ) were observed with HF substrates.

The values of methane production estimated for each BCRM from VFA production were greater ( $P<0.001$ ) than the measured values (Figure 4.7.1.), but there was a significant relationship ( $r = 0.612$ ;  $P<0.001$ ;  $n=128$ ) between the estimations of methane and measured values.



**Figure 4.7.1.** Relationship between methane production estimated from volatile fatty acid production (Demeyer, 1991) and directly measured in BCRM ( $r = 0.612$ ;  $P<0.001$ ). Pooled data from 128 observations using ruminal inoculum from sheep fed diets with forage:concentrate ratios of 70:30 (HF; squares) or 30:70 (HC; circles) and alfalfa hay (A; open symbols) or grass hay (G; closed symbols) as forage.



## DISCUSSION

*In vitro* techniques as BCRM are a useful alternative to *in vivo* experiments, but a source of inoculum is still required. Because diet composition and nutrient availability are the largest factors affecting microbial populations in the rumen, this will have a major impact on microbial activity of the inoculum (Mould et al., 2005). Compared with ruminants fed HC diets, a greater proportion of cellulolytic bacteria and methanogenic archaea is expected in HF-fed animals (Demeyer and Fievez, 2000). However, the degree to which concentrates affect ruminal digestion and microbial populations may depend on the nature and proportion of the concentrate, as well as the quality of the forage (Archimède et al., 1997). Therefore, for this study we selected four diets representative of those currently used in practical sheep feeding in Spain, which were formulated with two different F:C ratios and two FOR of contrasting quality.

### *Inocula characteristics*

Differences between inocula support previously reported variations in fermentation patterns in sheep (Moss et al., 1995; Carro et al., 2000) and goats (Cantalapiedra-Hijar et al., 2009) fed diets with different F:C ratios and/or FOR. In agreement with our results, increasing levels of concentrate in the diet of ruminants have been shown to decrease ruminal pH and increase lactate concentrations (Mackie et al., 1978; Brossard et al., 2003). However, the effects of F:C ratio in the diet on ruminal fermentation are largely influenced by the nature of the concentrate and the level of feeding. The unaffected total VFA concentrations and the observed changes in acetate and butyrate proportions as F:C ratio was reduced support previous work (Carro et al., 2000). Total protozoa numbers in all inocula were in the range of those previously reported for sheep (Santra et al., 1998; Brossard et al., 2004). Total concentration of protozoa in ruminal fluid generally increases with the addition of concentrate to forage diets (Franzolin and Dehority, 1996; Brossard et al., 2003), as it was observed in our study when concentrate in the diet was increased from 30 to 70%.

### *Effects of F:C ratio in the diet of donor sheep*

The effects of F:C ratio in the diet of donors on pH and gas production observed in this study are in agreement with earlier works (Cone et al., 1996; Menke and Steingass,

1988; Nagadi et al., 2000). The lower final pH observed in HC-inoculated BCRM would indicate that basal substrates were fermented more extensively than in HF-inoculated BCRM. This hypothesis is consistent with the greater amount of gas observed for all substrates in the HC-inoculated BCRM after both 8 and 24 h of incubation, as gas is directly related to the amount of substrate fermented (Menke and Steingass, 1988).

The greater total VFA concentrations observed in BCRM inoculated with HC inoculum is in agreement with previous observations by Kamel et al. (2008), and it might indicate either greater microbial concentrations or a more active microbial population in the fluid from HC-fed sheep. Because the amount of VFA produced in each culture was calculated by subtracting the amount present initially in the incubation medium from that determined at the end of the incubation period, it is clear that VFA could only arise from fermentation of substrate. Moreover, ruminal fluid was collected immediately before sheep feeding to minimize the amount of fermentable substrates in the inoculum. No measurement of microbial concentrations was done in the present study, but carboxymethylcellulase, xylanase and amylase activities were 1.7, 1.6 and 2.9 times greater in ruminal fluid from HC-fed sheep than in HF-fed animals, which supports the hypothesis that HC inoculum had a more active microbial population. In an experiment conducted in our laboratory with sheep fed the same diets, Ramos et al. (2008) observed that the relative abundance of methanogens (assessed by real-time PCR) in ruminal fluid from sheep fed HC diets was 6.5 times greater ( $P < 0.05$ ) than that in the rumen of HF-fed sheep. In addition, the greater protozoa concentrations observed in ruminal fluid from HC-sheep could also have contributed to the greater activity of HC compared with HF inoculum, which resulted in greater production of gas and VFA. The observed differences between HC and HF inocula in the amount of butyrate and other VFA may also indicate differences in microbial populations.

The proportion of methane in total gas (values not shown) increased as the incubation time progressed, with mean values of 5.0 and 5.3% after 8 h of incubation for HC and HF inoculum, respectively, and of 8.7 and 9.8% after 24 h of incubation. As pointed out by Getachew et al. (2005) this suggest that the slowly digestible fraction of feed (structural carbohydrates) is associated with greater methane production. The proportion of methane in the gas produced after 8 h of incubation was not affected ( $P =$

0.377 to 0.944) by the F:C ratio in the diet of donors with any incubated substrate, but after 24 h of incubation it was greater in HC-inoculated BCRM compared with those inoculated with ruminal fluid from HF-fed sheep (P = 0.003 to 0.025; mean values for all substrates of 8.75 and 9.99 % for HF and HC inoculum, respectively). As a consequence of the greater gas production and the greater proportion of methane in the gas, the production of methane after 24 h of incubation was increased by 17.5% (mean value for all substrates) by using HC compared with HF inoculum.

Methane production after 24 h of fermentation was 33.0 and 37.7 mL/g of DM for HF substrates incubated with HF and HC inoculum, respectively, and 38.7 and 44.4 mL/g of DM for HC substrates incubated with HF and HC inoculum, respectively. For the calculations it was assumed that one mol of methane occupies 22.4 L at standard conditions. Our results for HF substrates are in agreement with the values ranging from 30.1 to 35.7 mL/g DM reported by Getachew et al. (2005) after *in vitro* incubation of 7 total mixed diets containing from 31.0 to 47.4% of forage, and similar values have also been reported in sheep (Moss, 2002) and cattle (Yan et al., 2006). However, methane production values found in our study when incubating HC substrates were greater. This contrasts with previous *in vivo* research showing that reducing the F:C ratio in the diet led to a significant reduction in methane production expressed per unit of DM intake (Moss et al., 1995; Lovett et al., 2003). Decreased methane production arising from a reduced F:C ratio is due to a shift in ruminal fermentation patterns to propionate and a decline in ruminal pH (Van Kessek and Russell, 1996). Russell (1988) showed that methane production *in vitro* decreased dramatically at pH below 6.3. In our study, final pH values were above 6.6 in all BCRM, and the high pH values could have contributed to the increased methane production observed with HC substrates compared with HF ones.

The greater methane production found with HC inoculum compared with HF is in contrast with the observations that HC-fed ruminants have fewer methanogens in the rumen than those fed HF diets (Van Kessel and Russell, 1996; Demeyer and Fievez, 2000). However, the high fibrous nature of the concentrate used in the present experiment (containing 33.5% aNDF and only 32% cereal grains; Table 4.7.1.) possibly prevented the rapid fall in pH which is characteristic of animals given larger amounts of cereal grains and inhibits the activity of methanogens. In addition, the fact that animals

received mixed diets could have reduced the negative effects on pH usually observed by the fermentation of HC diets, because mixed diets tend to minimize the daily variations in rumen pH. The pH values in the inocula were always above 6.0 (individual values not shown), and initial pH in the cultures was above 6.8 in all incubation runs. Van Kessel and Russell (1996) reported that mixed ruminal bacteria from a concentrate-fed cow did not produce methane when used to inoculate *in vitro* cultures, but when the pH of the ruminal fluid was adjusted to pH 7.0, the absolute rate constant of methane production was as high as the one observed with ruminal fluid from a forage fed cow. In our study, both the high pH in all inocula and in the BCRM may have contributed to the greater methane production observed for HC compared with HF inocula.

Several authors (Horton et al., 1980; Tejido et al., 2002) have reported that feeding donor animals HC diets reduced *in vitro* digestibility of feeds compared with donor animals fed HF diets, although no effect of F:C ratio in the diet of donors has been observed in other studies (Nik-Khah and Tribe, 1977; Marinucci et al., 1992). In the present study, no effects were detected when HF substrates were incubated, but *in vitro* digestibility values for HC substrates were lower with HC inoculum, which is consistent with previous observations (Holden, 1999) indicating that the effect of donors' diet on *in vitro* digestibility varied with the tested feed.

### ***Effects of type of forage in the diet of donor sheep***

In general, ruminants fed high-quality diets have been reported to produce lower methane than those fed low-quality diets (Pinares-Patiño et al., 2003; Yan et al., 2006), as a lower proportion of structural carbohydrate content will change the fermentation pattern yielding less methane (Moe and Tyrrell 1979). In our study, the same substrates were incubated with all inocula, and pH values in the BCRM were not affected by FOR in the diet; therefore, the only factor that might explain the greater methane production observed for all substrates in the BCRM inoculated with from sheep fed A diets is the presence of different microbial populations in both types of inocula. Protozoa numbers were 1.3 times greater in A inoculum compared with G inoculum (mean values  $112 \times 10^3$  and  $85 \times 10^3/\text{mL}$ , respectively), and methane production *in vitro* has been shown to increase with the increase in protozoa population in the ruminal fluid used as inoculum (Newbold et al., 1995). Moreover, Ramos et al. (2008) observed that the relative

abundance of methanogens in ruminal fluid from sheep fed HFA diet was 1.7 times greater than in the rumen of sheep fed HFG diet, and 1.2 times greater in sheep fed HCA compared to those fed HCG.

A different mechanism that could help to explain the greater methane production observed with A inoculum would be a greater production of hydrogen substrate in A-inoculated BCRM. The amount of hydrogen in the BCRM was not measured, but carboxymethylcellulase and xylanase activities were 1.3 and 1.1 times greater in A than in G inoculum, respectively. A greater fibrolytic activity would result in enhanced acetate proportion, as it was observed in the BCRM inoculated with fluid from sheep fed A diets. Acetate is the predominant VFA produced by ruminal fermentation and is closely associated with hydrogen production; therefore, any increase in acetate production is expected to produce more hydrogen available to methanogens. In the present study, methane production after 24 h of incubation was positively related to acetate production ( $r=0.433$ ;  $P<0.001$ ;  $n=128$ ) and negatively to propionate production ( $r=0.388$ ;  $P<0.001$ ;  $n=128$ ). In a review on methane production in cattle, Johnson and Johnson (1995) noticed that acetate:propionate ratio has a major impact on methane production, as observed in our study ( $r=0.589$ ;  $P<0.001$ ;  $n=128$ ). All these relationships are in agreement with those previously found in other *in vitro* (Russell, 1998) and *in vivo* (Moss et al., 1995) studies.

The greater VFA production found for all substrates with A inoculum compared with G inoculum is in contrast to the lower substrate digestibility found with A inoculum when HC substrates were incubated, but the reasons are unknown. The BCRM inoculated with ruminal fluid from sheep fed A diets had greater  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentrations than G-inoculated BCRM, which may have been due to a greater  $\text{NH}_3\text{-N}$  amount added with the inoculum. The mean amount of  $\text{NH}_3\text{-N}$  added to each culture at the start of the incubation was 9.6, 6.0, 14.5 and 11.0 mg for HFA, HFG, HCA and HCG, respectively. When the net  $\text{NH}_3\text{-N}$  balance was calculated as the total amount of  $\text{NH}_3\text{-N}$  in the BCRM at the end of the incubation (12.6, 9.7, 17.9 and 12.6 mg per culture for BCRM inoculated with fluid from sheep fed HFA, HFG, HCA and HCG diets, respectively) minus the amount added with the incubation medium, mean values of 3.1 and 3.0 mg per culture were obtained for A and G-inoculated BCRM, revealing the lack of effect of FOR in the inocula on the  $\text{NH}_3\text{-N}$  balance.

Several studies (Pinares-Patiño, et al., 2003; Waghorn et al., 2006; Ya et al., 2006) have reported an important variation between ruminants of the same species in methane emissions per unit of feed intake. In our study, we observed that methane production for each diet and substrate (n=6) was rather consistent in BCRM inoculated with ruminal fluid from sheep No. 1, 4, 5 and 6, with a mean value after 24 h of incubation for all diets and substrates of 677  $\mu\text{mol}$  and a coefficient of variation of 8.8%. Mean values for sheep No. 2 and 3 were 552 and 858  $\mu\text{mol}$ . When data from the 6 sheep were pooled together, the mean value (686  $\mu\text{mol}$ ) was similar to the one obtained with 4 sheep but the coefficient of variation increased to 15.5%. Because the study was conducted *in vitro*, differences between BCRM inoculated with fluid from different sheep fed the same diet can only be attributed to differences in microbial populations in the inocula. Our results support previous observations on the considerable variation in the amount of methane produced by individual animals. In addition, variations between animals were also observed in the hydrogen recovery, with mean values of 77, 77, 89, 90, 83 and 83% for sheep No. 1, 2, 3, 4, 5 and 6, respectively. These values were in the range of those found in our laboratory in studies with BCRM (Carro and Ranilla 2003; García-Martínez et al., 2005).

In agreement with our results, estimated values of methane production have been usually reported to be greater than those directly measured (Moss et al., 1995; Getachew et al., 2005), due to assimilation of hydrogen during the synthesis of microbial polymers and in other reactions that are not accounted for in the stoichiometric estimation (Hegarty and Nolan, 2007). Getachew et al. (2005) observed that estimated methane values were only 8.6% greater than those measured in BCRM, although in the present study estimated values were 25.4 and 17.3% greater than those measured with HF and HC substrates, respectively. In contrast, Eun et al. (2004) reported a poor correlation between estimated and measured methane values in dual-flow fermenters.

## CONCLUSIONS

For all substrates, *in vitro* methane production was increased by decreasing the F:C ratio in the diet of donor sheep and by feeding alfalfa hay compared with grass hay. There were clear differences in methane production among inocula from different

sheep, which persisted across diets fed to sheep and incubated substrates. Methane emission estimated from VFA production was 21% greater than that directly measured, but both values were significantly related. Methane production was positively related to acetate production and acetate:propionate ratios in the BCRM.

## REFERENCES

- Association of Official Analytical Chemists. AOAC, 1999. Official Methods of Analysis, 16th Edition, 5<sup>th</sup> revision. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Archimède, H., Sauvant, D., Schmidely, P., 1997. Quantitative review of ruminal and total tract digestion of mixed diet organic matter and carbohydrates. *Reprod. Nutr. Develop.* 7, 173-189.
- Bhatta, R., Enishi, O., Takusari, N., Higuchi, K., Nonaka, I., Kurihara, M., 2008. Diet effects on methane production by goats and a comparison between measurement methodologies. *J. Agric. Sci.* 146, 705-715.
- Brossard, L., Martin, C., Chaucheyras-Durand, F., Michalet-Doreau, B., 2004. Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* 44, 195-206.
- Brossard, L., Martin, C., Michalet-Doreau, B., 2003. Ruminal fermentative parameters and blood acid-basic balance changes during the onset and recovery of induced latent acidosis in sheep. *Anim. Res.* 52, 513-530.
- Busquet M., Calsamiglia S., Ferret, A., Carro, M.D., Kamel, C., 2005. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 88, 4393-4404.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D.R., Martín-García, A.I., Molina-Alcaide, E. 2009. Effects of forage:concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats. *J. Anim. Sci.* 87, 622-631.
- Carro, M.D., 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* semicontinuous culture system (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 82, 149-157.
- Carro, M.D., Ranilla, M.J., 2003. Influence of different concentrations of disodium fumarate on methane production and fermentation of concentrate feeds by rumen microorganisms *in vitro*. *Brit. J. Nutr.* 90, 617-623.

- 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. *Anim. Sci.* 70, 127-134.
- Carro, M.D., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., 2005. Using the *in vitro* gas production technique to test feed additives: effects of correcting values for different blanks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123, 173-184.
- 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.
- Dehority, B.A., 1993. Laboratory manual for classification and morphology of ruminal ciliate protozoa. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Demeyer, D.I., 1991, Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. In: Jouany, J.P. (Ed.), *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*. INRA Editions, Paris, France. pp. 217-237.
- Demeyer, D., Fievez, V. 2000. Ruminants et environnement: la méthanogénèse (Ruminants and environment: methanogenesis). *Ann. Zootech.* 49, 95–112.
- Demeyer, D.I., 1991. Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. In: Jouany, J.P. (Ed.), *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*. INRA Editions, Paris, France. pp. 217-237.
- Eun, J.S., Fellner, V., Gumpertz, M.L., 2004. Methane production by mixed ruminal cultures incubated in dual-flow fermenters *J. Dairy Sci.* 87, 112–121.
- Franzolin, R., Dehority, B. A. 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *J. Anim. Sci.* 74, 2803-2809.
- García-Martínez, R., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Carro, M.D., 2005. Effects of disodium fumarate on *in vitro* rumen microbial growth, methane production and fermentation of diets differing in their forage:concentrate ratio. *Brit. J. Nutr.* 94, 71-77.
- Getachew, G., Robinson, P.H., DePeters, E.J., Taylor, S.J., Gisi, D.D., Higginbotham, G.E., Riordan, T.J., 2005. Methane production from commercial dairy rations estimated using an *in vitro* gas technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 391-403.



- Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Carro, M.D., 2008. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141, 306-325.
- Hegarty, R.S., Nolan, J.V., 2007. Estimation of ruminal methane production from measurement of volatile fatty acid production. In: Makkar, H.P.S., Vercoe, P.E. (Eds.), *Measuring Methane Production from Ruminants*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 69-92.
- Hervás, G., Ranilla, M.J., Mantecón, A.R., Tejido, M.L., Frutos, P., 2005. Comparison of sheep and red deer rumen fluids for assessing nutritive value of ruminant feedstuffs. *J. Sci. Food Agric.* 85, 2495-2502.
- Holden, L.A., 1999. Comparison of methods of *in vitro* dry matter digestibility for ten feeds. *J. Dairy Sci.* 82, 1791-1794.
- Horton, G.M., Christensen, D.A., Steacy, G.M., 1980. *In vitro* fermentation of forages with inoculum from cattle and sheep fed different diets. *Agron. J.* 72, 601-605.
- Johnson, K.A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73, 2483-2492.
- Kamel, C., Greathead, H.M.R., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., 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.
- López, S., Carro, M.D., González, J.S., Ovejero, F.J., 1998. Comparison of different *in vitro* and *in situ* methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 73, 99-113.
- Lovett, D., Lovell, S., Stack, L., Callan, J., Finlay, M., Conolly, J., O'Mara, F.P., 2003. Effect of forage/concentrate ratio and dietary coconut oil level on methane output and performance of finishing beef heifers. *Livest. Prod. Sci.* 84, 135-146.
- 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. *J. Agric. Sci.* 90, 241-254.
- Marinucci, M.T., Dehority, B.A., Loerch, S.C., 1992. *In vitro* and *in vivo* studies of factors affecting digestion of feeds in synthetic fiber bags. *J. Anim. Sci.* 70, 296-307.
- Menke, K.H., Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28, 7-55.

- Moe, P.W., Tyrrell, H.F., 1979. Methane production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 62, 1583–1586.
- Moss, A.R., 2002. Environmental control of methane production by ruminants. In: Takahashi, J., Young, B.A. (Eds.), *Greenhouse Gases and Animal Agriculture*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 67–76.
- Moss, A.R., Givens, D.I., 1997. Methane production from a range of feedstuffs as determined *in vitro* using the cumulative gas production technique and compared with that measured *in vivo*. *Proc. Brit. Soc. Anim. Sci.* 194 (Abstr.).
- Moss, A.R., Jouany, J. P., Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49, 231-253.
- Moss, A.R., Givens, D.I., Garnsworthy, P.C., 1995. The effect of supplementing grass silage with barley on digestibility, *in sacco* degradability, rumen fermentation and methane production in sheep at two levels of intake. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55, 9– 33.
- 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.
- Nagadi, S., Herrero, M., Jessop, N.S., 2000. The influence of diet of the donor animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and *in vitro* gas production degradability parameters. 2000. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87, 231-239.
- Newbold, C.J., Lassalas, B., Jouany, J.P., 1995. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 230-234.
- Nik-Khah, A., Tribe, D.E., 1977. A note on the effect of diet on the inoculum used in digestibility determination *in vitro*. *Anim. Prod.* 25, 103-106.
- NRC, 1985. *Nutrient Requirement of Sheep*. 6<sup>th</sup> ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Ogimoto, K., Imai, S., 1981. *Atlas of Rumen Microbiology*. Tokyo: Japan Scientific Societies Press.
- Pinares-Patiño, C.S., Ulyatt, M.J., Lassey, K.R., Barry, T.N., Holmes, C.W., 2003. Persistence of differences between sheep in methane emission under generous grazing conditions, *J. Agric. Sci.* 140, 227– 233.
- Ramos, S., Yáñez-Ruíz, D., Carro, M.D., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Newbold, C.J. 2008. Shifts in rumen microbial communities in sheep fed either alfalfa hay or grass

- hay after an abrupt change to a high-concentrate diet. Proc. of the 6th INRA-RRI Symposium: Gut Microbiome. Functionality, Interaction with the Host and Impact on the Environment. pp. 30-31.
- Russell, J.B., 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. J. Dairy Sci. 81, 3222-3230.
- Santra, A., Karim, S. A., Mishra, A. S., Chaturvedi, O. H., Prasa, R 1998. Rumen ciliate protozoa and fiber digestion in sheep and goats. Small Ruminant Res. 30, 13–18.
- Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Carro, M.D., 2002. *In vitro* dry matter digestibility of forages as influenced by the source of inoculum (sheep rumen liquor vs. fermenters fluid) and the forage to concentrate ratio in the diet of donors. Anim. Feed Sci. Technol. 97, 41-51.
- Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Carro, M.D., 2002. *In vitro* dry matter digestibility of forages as influenced by the source of inoculum (sheep rumen liquor vs. fermenters fluid) and the forage to concentrate ratio in the diet of donors. Anim. Feed Sci. Technol. 97, 41-51.
- Van Kessel, J.A.S, Russell, J.B., 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. FEMS Microbiol. Lett. 20, 205-210.
- Waghorn, G.C., Woodward, S.L., Tavendale, M., Clark, D.A., 2006. Inconsistencies in rumen methane production - effects of forage composition and animal genotype. Int. Congr. 1293, 115– 118.
- Yan, T., Mayne, C.S., Porter, M.G., 2006. Effects of dietary and animal factors on methane production in dairy cows offered grass silage-based diets. Int. Congr. 1293, 123– 126.



*Capítulo 5*  
*Discusión general*



El uso de animales quirúrgicamente modificados está cada vez más restringido en la UE debido a razones éticas y de bienestar animal. Además, la experimentación *in vivo* tiene un alto costo en términos laborales y económicos. Las técnicas de simulación de la fermentación ruminal *in vitro* ofrecen una alternativa al uso de animales experimentales, por lo que debe avanzarse en su conocimiento con el fin de mejorar cada vez más su potencial de simulación de los procesos fermentativos *in vivo*. Por ello, el objetivo fundamental de la presente Tesis Doctoral fue analizar los efectos que tienen diferentes aspectos del manejo de algunas técnicas de simulación de la fermentación *in vitro*, principalmente el sistema Rusitec y secundariamente los cultivos discontinuos de microorganismos ruminales (BCRM), sobre la simulación de la fermentación ruminal y las comunidades microbianas. Para ello se realizaron en primer lugar pruebas experimentales con fermentadores, cuatro de ellas de tipo metodológico y otra en la que se comparó la fermentación ruminal de cuatro dietas administradas a ovejas con la obtenida en fermentadores Rusitec. Finalmente, se llevó a cabo una prueba con BCRM para analizar los efectos de la dieta de las ovejas donantes de líquido ruminal sobre la producción de metano y los parámetros ruminales.

Cuando se inocula un sistema *in vitro* con microorganismos ruminales, estos deben hacer frente a los cambios ambientales (temperatura, pH, ritmos de dilución, etc.) que se producen en su entorno dado que las condiciones, pese a parecerse a las existentes *in vivo*, nunca son exactamente iguales. Por ello, la adaptación de las comunidades microbianas a las nuevas condiciones establecidas en el interior de los sistemas *in vitro* es un aspecto importante a nivel metodológico. En el caso de los fermentadores, estas comunidades cambian a lo largo de los días de incubación (Slyter y Putnam, 1967; Prevot *et al.*, 1994) y es necesario que alcancen condiciones de equilibrio, entendiendo este como el momento en el que la salida diaria de productos de fermentación no cambia significativamente de un día para otro en varios días consecutivos, antes de comenzar a tomar muestras. Czerkawski y Breckenridge (1977, 1979a) pusieron de manifiesto que en fermentadores Rusitec era posible alcanzar estas condiciones en 4-6 días cuando se utilizaban dietas equilibradas, pero que se requerían mayores tiempos de adaptación al incubar dietas de baja calidad. Pese al extendido uso de los fermentadores en los estudios de fermentación ruminal *in vitro*, no existe consenso en lo relativo al tiempo de adaptación del sistema, encontrándose en la bibliografía científica tiempos de adaptación que van desde 5 hasta 11 días (Czerkawski y Breckenridge, 1977, 1979a; Carro y Miller, 1999; Godoy y Meschy, 2001; Jalc *et al.*, 2006; Giraldo *et al.*, 2007;

Carro *et al.*, 2009). Debido a ello, en el primer experimento de esta Tesis Doctoral se determinaron diariamente los principales parámetros de fermentación durante 14 días para analizar su evolución y determinar cuándo se podía considerar que el sistema estaba adaptado. Se planteó un experimento en el que se utilizaron dos ritmos de dilución (DL) de la fase líquida (alto, HDL, 5,42%/h; bajo, LDL, 3,78%/h) y dos tiempos de retención (RT) del concentrado (24 horas, T24; 48 horas, T48). Debido a que se encontraron interacciones significativas entre el día de incubación y el DL y el RT del concentrado, los efectos del día de incubación se analizaron de forma independiente para cada tratamiento experimental.

El día de incubación afectó a la producción total de VFA, amoníaco y láctico en todos los tratamientos, alcanzándose condiciones estables a partir del día 6. Las proporciones molares de los diferentes VFA también variaron durante los primeros días, pero se estabilizaron al cabo de 6 días. Como norma general, la estabilización requirió un mayor número de días en los fermentadores LDL. Por ejemplo, en el caso del butírico, las proporciones molares alcanzaron el equilibrio en los fermentadores HDL tras 3-4 días, mientras que en los fermentadores LDL fueron necesarios 7-8 días. La proporción molar de los VFA minoritarios (suma de isobutírico, isovalérico y valérico) aumentó de forma muy marcada los primeros 4 días de incubación, hasta llegar aproximadamente al doble de la inicial, y se estabilizó a partir del día 5 para los fermentadores HDL y del día 9 en los LDL.

Un hecho llamativo fue el marcado aumento de la proporción molar de caproico durante los primeros días, que llegó a estabilizarse a partir del día 5 en todos los fermentadores. Varios autores (Gómez *et al.*, 2005; Giraldo *et al.*, 2007; Carro *et al.*, 2009) han observado concentraciones anormalmente elevadas de este ácido en fermentadores Rusitec que recibían dietas de composición variable.

Como conclusión general de esta prueba se puede afirmar que fueron necesarios 6 días para que el sistema alcanzara el estado de equilibrio. En general, los fermentadores que operaron con el ritmo de dilución más alto y el tiempo de retención del concentrado de 24 horas se estabilizaron antes que el resto. Además, en estos fermentadores se observaron concentraciones de caproico y relaciones acético:propiónico más fisiológicas que en el resto, lo que indicaría que estas condiciones pueden contribuir a mejorar la simulación de la fermentación en fermentadores Rusitec.

Otro aspecto metodológico importante en los fermentadores es el hecho reconocido de que las comunidades protozoarias se reducen a lo largo de los días de incubación, e



incluso pueden llegar a desaparecer en los fermentadores de flujo continuo (Crawford *et al.*, 1980a; Moumen *et al.*, 2007). Sin embargo, en la mayoría de los trabajos se suelen contar los protozoos al comienzo y al final del experimento, y no se conoce mucho acerca de la evolución de las comunidades protozoarias en los fermentadores a lo largo del periodo de adaptación. Por ello, en la segunda prueba se planteó analizar la evolución de las comunidades protozoarias a lo largo de 14 días de incubación en fermentadores Rusitec. Dependiendo de los grupos, los protozoos muestran afinidad por uno u otro tipo de sustrato, por lo que la dieta es uno de los factores que condiciona en mayor medida la comunidad de protozoos en el rumen. Además, la dieta que recibe el animal o el fermentador determina el pH ruminal, factor que afecta también a las comunidades de protozoos. Con el fin de evaluar el efecto de la dieta sobre la evolución de los protozoos, en esta prueba los fermentadores recibieron cuatro dietas diferentes: HFA (70% heno de alfalfa y 30% concentrado), HFG (70% heno de gramíneas y 30% concentrado), HCA (30% heno de alfalfa y 70% concentrado) y HCG (30% heno de gramíneas y 70% concentrado). El forraje y el concentrado se incubaron en bolsas separadas, permaneciendo en el interior del fermentador durante 48 y 24 horas, respectivamente, y el ritmo de dilución fue de 5,14%/h. Para que los protozoos se mantengan en los fermentadores, necesitan tiempo para reproducirse antes de ser eliminados por lavado hacia fuera del sistema (Abe y Kumeno, 1973; Czerkawski y Breckenridge, 1977), por lo que ritmos de dilución elevados hacen desaparecer a los protozoos (Crawford *et al.*, 1980a). Sin embargo, ritmos de dilución muy bajos provocan la acumulación de metabolitos y productos secundarios que pueden resultar tóxicos para las comunidades microbianas. En el recuento de protozoos se identificaron las familias Isotrichidae y Ophryoscolecidae, y dentro de la segunda, las subfamilias Entodiniinae, Diplodiniinae y Ophryoscolecinae.

El número total de protozoos disminuyó muy rápidamente a partir del primer día del experimento, aunque el último día se observaron protozoos en todos los fermentadores, con valores de 6,14, 8,52, 3,30 y 6,76  $\times 10^3$ /ml para las dietas HFA, HFG, HCA y HCG, respectivamente. La concentración de protozoos fue mayor en los fermentadores que recibían dietas con un elevado contenido en forraje (HF) que en los que recibían dietas con un contenido alto de concentrados (HC). Asimismo, el número de protozoos fue más elevado en los fermentadores en los que el forraje administrado fue heno de gramíneas que en los que recibían heno de alfalfa.

Los protozoos de la familia Isotrichidae se adhieren en mayor o menor grado a las partículas de fibra dependiendo de la cantidad de carbohidratos solubles, presentan fenómenos de quimiotaxis hacia los oligosacáridos, y engullen almidón y azúcares simples. Pese a ello, esta familia desapareció completamente el día 10 del experimento en todos los fermentadores que recibían las dietas HC. Esta desaparición concuerda con datos obtenidos en trabajos previos (Carro *et al.*, 1992, 1995) y podría estar relacionada con el pH ruminal. El pH del contenido de los fermentadores alcanzó valores mínimos de 5,76 y 5,74 con las dietas HCA y HCG, respectivamente, mientras que en los fermentadores que recibían las dietas HFA y HFG no descendió de 6,40 y 6,10, respectivamente, a lo largo del día. Eadie (1962) observó que los Isotrichidae no se desarrollaban en el rumen a pH inferiores a 6,5. El mayor número de Isotrichidae en las dietas que contenían heno de alfalfa puede ser debido también a este factor, dado que con estas dietas el pH fue más elevado que con aquellas que contenían heno de gramíneas.

Los protozoos pertenecientes a la familia Ophryoscolecidae son celulolíticos en su mayoría, ingieren partículas de forraje y depredan bacterias y otros protozoos. Los protozoos de la subfamilia Entodiniinae permanecieron en todos los fermentadores hasta el final del experimento, mostrando las mayores concentraciones, tal y como ha sido previamente observado por otros autores (Slyter y Putnam, 1967; Carro *et al.*, 1992, 1995), aunque estas fueron mucho más bajas que las existentes al comienzo del experimento. Este grupo fue más abundante en los fermentadores que recibían dietas HC, lo cual puede estar relacionado con la capacidad de algunos *Entodinium* para utilizar almidón y con su mayor resistencia a los descensos del pH ruminal (Williams y Coleman, 1992; Hristov *et al.*, 2001). Además, su tiempo de generación es, en general, más corto que el de otros grupos, y pudieron verse favorecidos por los relativamente largos tiempos de retención utilizados en los fermentadores (48 y 24 h para FOR y CON, respectivamente).

Los protozoos de la subfamilia Diplodiniinae disminuyeron rápidamente desde el inicio del experimento, y el día 10 habían desaparecido de los fermentadores que recibían dietas HC, probablemente debido al descenso del pH, tal y como se ha observado previamente (Franzolin y Dehority, 1996; Goad *et al.*, 1998; Hristov *et al.*, 2001). El secuestro de los protozoos entre las partículas sólidas de la digesta es un hecho probado que ayuda a su permanencia en el rumen (Nakamura y Kurihara, 1978) y en los fermentadores (Crawford *et al.*, 1980a). Sin embargo, los protozoos de la

subfamilia Ophryoscolecinae desaparecieron de todos los fermentadores sólo 6 días después de haber comenzado la incubación. Esto pudo ser debido a su elevado tiempo de generación, que puede oscilar entre 29 horas y 3 días (Dehority, 2004; Sylvester *et al.*, 2009), con lo que la retención del forraje durante 48 horas en el presente experimento pudo no haber sido suficiente para mantenerlos. Además, este grupo presenta tamaños muy grandes, de hasta 200 micras, mientras que el diámetro de poro de las bolsas de nailon utilizadas en el Rusitec es de 100 micras. Esto pudo haber impedido la colonización del sustrato sólido por parte de este grupo, propiciando por ello que fueran arrastrados fuera del sistema antes de finalizar el periodo de adaptación. En resumen, se puede afirmar que los fermentadores Rusitec fueron capaces de mantener comunidades de protozoos representativas de sólo algunas de las existentes en el momento de la inoculación, aunque en número mucho más reducido. Algunos protozoos respondieron a los cambios de dieta en los fermentadores de manera similar a como lo hacen *in vivo*, pero otros no pudieron ser mantenidos en el sistema con ninguna de las dietas. En resumen, se puede afirmar que los fermentadores Rusitec fueron capaces de mantener comunidades de protozoos representativas de sólo algunas de las existentes en el momento de la inoculación, aunque en número mucho más reducido. Algunos protozoos respondieron a los cambios de dieta en los fermentadores de manera similar a como lo hacen *in vivo*, pero otros no pudieron ser mantenidos en el sistema con ninguna de las dietas.

La tercera prueba metodológica se planteó para analizar los efectos del DL y el RT del sólido sobre la fermentación ruminal y el crecimiento microbiano en fermentadores Rusitec. Ambos parámetros pueden ser altamente variables *in vivo*, y se ven afectados por factores como el ambiente, la condición fisiológica del animal, las características de la dieta y el nivel de ingestión, entre otros (Stern *et al.*, 2006). Por lo tanto, es necesario determinar qué efectos tienen, *per se*, los cambios en el DL y el RT del sólido sobre la fermentación y el crecimiento microbiano, de forma que puedan ser modificados *in vitro*, y posteriormente *in vivo*, para conseguir una síntesis microbiana óptima. Dadas las dificultades para evaluar la influencia de estos factores *in vivo*, la mayor parte de los datos disponibles han sido obtenidos en experimentos *in vitro* llevados a cabo con fermentadores de flujo continuo. En el caso de los fermentadores Rusitec, desde el trabajo clásico de Czerkawski y Breckenridge (1977) no se ha llevado a cabo ningún otro trabajo sobre este aspecto, a excepción del realizado por Carro *et al.* (2005) sobre los efectos de diferentes DL. Además, en todos los experimentos con fermentadores

Rusitec el RT del alimento es de 48 horas, tanto para el forraje como para el concentrado y ningún trabajo ha analizado el posible efecto de diferentes RT del sólido. En trabajos previos de nuestro grupo (Gómez *et al.*, 2005; Carro *et al.*, 2009) se ha observado que la simulación de la fermentación ruminal en fermentadores Rusitec cuando se incuban dietas ricas en concentrado no es satisfactoria, por lo que se planteó que una disminución del RT del concentrado podría mejorar los resultados, ya que *in vivo* los concentrados permanecen en el rumen un menor tiempo que los forrajes (Mambrini y Peyraud, 1997).

Experimentalmente, la forma habitual de incrementar el DL es aumentar la cantidad de saliva artificial que entra en los fermentadores en una unidad de tiempo determinada, hecho que generalmente provoca un aumento de la capacidad tampón del sistema, y, consecuentemente, aumentos del pH que pueden enmascarar el efecto del DL. Por lo tanto, los efectos del DL y del pH son a menudo solapados e indiferenciables. Además, en los fermentadores de flujo continuo simple utilizados en algunos experimentos (Meng *et al.*, 1999) la fracción sólida y líquida de la digesta salen del sistema simultáneamente, y el aumento del DL resulta en un descenso concomitante del tiempo de retención del sólido, dificultando la distinción del efecto relativo de cada factor. Por el contrario, los fermentadores de flujo continuo doble permiten un control más preciso del DL y el RT del sólido (Hoover *et al.*, 1984; Schadt *et al.*, 1999). En los fermentadores de flujo semicontinuo Rusitec, el alimento es incubado en bolsas de nailon que son retiradas del sistema en tiempos prefijados, permitiendo así un control muy preciso sobre el RT del sólido. Por último, la información disponible hasta el momento sobre estos factores ha sido obtenida en experimentos realizados con inóculo procedente de ganado vacuno, y hasta ahora no se han realizado estudios en fermentadores Rusitec inoculados con fluido ruminal de ovino. Por ello, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de dos DL (alto, HDL, 5,42%/h; bajo, LDL, 3,78%/h) y dos RT del concentrado (24h (T24) y 48h (T48)) sobre la fermentación ruminal y el crecimiento microbiano en fermentadores Rusitec inoculados con fluido ruminal de ovejas y mantenidos en condiciones similares de pH. Hasta el momento, este es el primer estudio en el cual se seleccionaron diferentes RT para el forraje y el concentrado en fermentadores Rusitec, en los que habitualmente la totalidad de la dieta se incubaba durante 48 horas. Usar diferentes RT para el forraje y el concentrado reflejaría de una forma más cercana la situación *in vivo*, tal y como se ha comentado anteriormente.

Como cabía esperar, se observó un incremento en la cantidad diaria de efluente cuando se aumentó el DL, mientras que el pH antes de administrar el alimento y la media de los valores de pH en las 9 horas posteriores a la alimentación no se vieron afectados por este factor. La desaparición aparente de la dieta fue mayor en los fermentadores HDL que en los LDL, lo cual concuerda con algunos estudios previos (Crawford *et al.*, 1980a; Eun *et al.*, 2004; Fondevila y Pérez-Espés, 2008), y contrasta con otros en los cuales no se observó un efecto del DL sobre estos parámetros (Czerkawski y Breckenridge, 1977; Carro *et al.*, 1995). Las posibles razones de la discrepancia entre los diferentes estudios incluyen diferencias en las dietas incubadas, diferentes tipos y modelos de fermentador, y distintas características de los inóculos. En nuestro estudio elegimos una dieta basal con un alto contenido en concentrado por ser representativa de las utilizadas en la alimentación práctica del ovino en nuestra región, pero su composición era distinta de las dietas formuladas para vacas lecheras utilizadas en otros trabajos.

Las interacciones DL x RT del concentrado observadas en la desaparición aparente de la materia seca, fibra neutro detergente y fibra ácido detergente del concentrado, indicaron que los efectos del DL fueron más pronunciados en los fermentadores T48 que en los T24. Contrariamente a lo esperado, la desaparición aparente de la materia seca, fibra neutro detergente y fibra ácido detergente del forraje fueron mayores en los fermentadores T24 que en los T48, pese a que el RT del forraje fue de 48 horas en todos los fermentadores. La desaparición aparente del concentrado se incrementó cuando su RT aumentó de 24 a 48 horas, lo cual concuerda con resultados previos de otros autores (Crawford *et al.*, 1980a; Shriver *et al.*, 1986; Schadt *et al.*, 1999).

Sólo unos pocos estudios han investigado los efectos del DL y el RT sobre la producción de metano por los microorganismos ruminales, y los resultados son contradictorios. Eun *et al.* (2004) observaron un aumento en la producción de CH<sub>4</sub> a medida que aumentaba el DL, mientras que Isaacson *et al.* (1975) observaron el efecto contrario. En esta prueba, la producción de CH<sub>4</sub> no se vio afectada por el DL, posiblemente debido a que el pH se mantuvo constante. La producción de metano se ve fuertemente afectada por el pH ruminal, y Russell en 1998 demostró que su producción *in vitro* descendía drásticamente cuando el pH bajaba de 6,3. En nuestra prueba el pH se mantuvo en todos los fermentadores por encima de este valor. El ritmo de crecimiento de los metanógenos es relativamente lento, lo que puede resultar en números reducidos de arqueas metanogénicas en los fermentadores con altos DL (Eun *et al.*, 2004), pero el

HDL en nuestro estudio (5,4%/h) no tuvo un efecto negativo en la producción de metano.

Como se ha observado en trabajos previos, los cambios en el DL pueden afectar a la producción de VFA y a su perfil, pero los efectos de este factor sobre los citados parámetros son contradictorios. El aumento del DL en nuestro estudio produjo un aumento las proporciones molares de propiónico sin afectar a las de acético, tal y como se ha señalado en otros estudios (Isaacson *et al.*, 1975; Carro *et al.*, 1995). Contrastando con esto, otros autores han observado que las proporciones molares de propiónico fueron más bajas (Crawford *et al.*, 1980a) o no se vieron afectadas (Eun *et al.*, 2004; Fondevila y Pérez-Espés, 2008) debido a incrementos del DL. En el presente estudio no se observaron cambios en las proporciones de butírico, pero otros autores (Carro *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 1999; Eun *et al.*, 2004) encontraron un descenso en la proporción de butírico cuando aumentaba el DL. Estos resultados contradictorios pueden deberse a varios factores, uno de los cuales es la dieta que reciben los diferentes sistemas de fermentación (Meng *et al.*, 1999).

En concordancia con nuestros resultados, Eun *et al.* (2004) observaron mayores proporciones de isovalérico y valérico cuando se incrementaba el DL, lo que podría indicar una mayor actividad proteolítica. Esta hipótesis también está sugerida por la mayor producción de N amoniacal y el menor enriquecimiento en <sup>15</sup>N observado en los fermentadores HDL en comparación con los fermentadores LDL. La mayor concentración de N amoniacal en los fermentadores HDL pudo deberse a una mayor producción o a una menor utilización de este por los microorganismos ruminales.

La producción de VFA fue mayor en los fermentadores T48 comparados con los T24, lo cual resulta congruente con la mayor desaparición aparente de la dieta observada en los primeros. El aumento del tiempo de retención del concentrado resultó en un incremento de la proporción de acético y un descenso de las proporciones de propiónico, isovalérico y valérico. Los carbohidratos no estructurales probablemente fueron fermentados durante las primeras horas de la incubación, quedando a disposición de los microorganismos solamente los carbohidratos estructurales transcurridas las primeras 24 horas. Esto puede explicar el aumento en la proporción acético y la producción de metano y el descenso en la proporción de propiónico observados en los fermentadores T48 comparados con los T24. Las proporciones molares de caproico y la relación acético:propiónico fueron menores en los fermentadores T24 comparados con los T48, y en los HDL comparados con los LDL. Esto parece indicar que las

concentraciones anormalmente elevadas de caproico (no encontradas de forma fisiológica *in vivo*) observadas en trabajos previos en fermentadores Rusitec que recibían dietas HC (Gómez *et al.*, 2005; Carro *et al.*, 2005) pueden deberse al elevado RT del concentrado en el interior de los fermentadores (48 horas en los experimentos citados) y a los bajos DL (en torno a 3,8% / h). La utilización de DL más altos y RT del concentrado menores en fermentadores Rusitec podría contribuir a mejorar la simulación de la fermentación *in vivo* cuando se utilizan dietas con mucho concentrado, como ha sido sugerido previamente (Carro *et al.*, 2009).

Los cambios observados en el contenido en N de las bacterias asociadas a la fase sólida y líquida (SAM y LAB) podrían indicar modificaciones en las comunidades microbianas debidas a los cambios en el DR y el RT. La incorporación de N amoniacal por las SAB tendió a ser mayor en los fermentadores HDL comparada con los LDL, lo cual podría indicar que las comunidades bacterianas que se desarrollan en los fermentadores sí se vieron afectadas por el DL. De acuerdo con esta hipótesis, la actividad xilanas del fluido ruminal fue mayor y la actividad carboximetilcelulasa tendió a serlo en los fermentadores HDL que en los LDL, hecho que concuerda con la mayor desaparición de la fibra observada en los fermentadores HDL y que sugiere el desarrollo de comunidades microbianas con una mayor actividad fibrolítica. Por el contrario, el RT del concentrado no afectó a las actividades enzimáticas del fluido ruminal.

En general, los estudios *in vitro* con cultivos puros o mixtos de bacterias ruminales han indicado un mayor crecimiento microbiano y una mayor eficiencia del mismo al aumentar el DL (Isaacson *et al.*, 1975; Stern y Hoover, 1979; Meng *et al.*, 1999), disminuir el RT del sólido (Schadt *et al.*, 1999) o modificando ambos factores (Crawford *et al.*, 1980a,b; Shriver *et al.*, 1986). Sin embargo, en nuestro estudio, el DL no afectó al flujo total de N microbiano. En estudios previos en los que se ha observado un incremento del crecimiento microbiano al aumentar el DL (Meng *et al.*, 1999; Eun *et al.*, 2004) el pH aumentó en respuesta al aumento del DL, mientras que en nuestra prueba los valores de pH se mantuvieron constantes, por los resultados no son directamente comparables. Además, los DL en nuestra prueba fueron más bajos que los utilizados en los citados estudios.

En los fermentadores Rusitec, la fase sólida sale del sistema cuando se retiran las bolsas de nailon que contienen el alimento, de forma manual, una vez al día. La proporción de N microbiano en la digesta sólida obtenida de los fermentadores fue

mayor en los HDL comparados con los LDL (47,5 y 42,9%, respectivamente; resultados no mostrados), lo que podría indicar que el HDL promovió una mayor colonización de las partículas del alimento. Pese a esto, el flujo diario de N de SAB fue más bajo comparado con el de los fermentadores LDL. Esto se debió a las menores cantidades de residuos de forraje y concentrado recogidas a diario en los fermentadores HDL, provocadas por la mayor desaparición del sustrato. Las SAB representaron una menor proporción del flujo de N microbiano en los fermentadores HDL comparados con los LDL, pero los valores observados estuvieron en el rango de los previamente encontrados en fermentadores (Ranilla y Carro, 2003) y en rumiantes (Vlaemink *et al.*, 2006) alimentados con dietas HC.

Aunque los DL elevados a menudo van asociados con RT del sólido en el rumen más cortos (Stern *et al.*, 2006), en los fermentadores Rusitec el RT de la fase sólida no se ve afectado por el DL, por lo que los efectos de ambos factores pueden analizarse independientemente. En nuestra prueba, el flujo total de N microbiano fue 1,12 veces mayor en los fermentadores T48 comparado con los T24. Esto se debió al mayor flujo de SAB observado en los T48, porque las diferencias en el flujo de LAB no fueron significativas. La proporción de N microbiano en el sustrato tras la incubación en los fermentadores fue mayor en los fermentadores T48 que en los T24 (49,5 y 40,9%, respectivamente), lo cual pudo deberse a que los microorganismos tuvieron más tiempo para colonizar las partículas de alimento. Aunque la cantidad de residuo de concentrado fue más baja en los fermentadores T48 debido a la mayor desaparición, el flujo de SAB fue mayor debido a la mayor cantidad de microorganismos ligados a las partículas del concentrado.

Los valores de EMG estuvieron en el rango de los encontrados en estudios previos con fermentadores que recibían dietas ricas en concentrado (Meng *et al.*, 1999; Carro *et al.*, 2009). La EMG disminuyó al aumentar el DL y disminuir el RT del concentrado, sin que se observase una interacción significativa entre estos factores. Hoover *et al.* (1982, 1984) observaron efectos similares al aumentar el DL, pero no encontró efecto cuando el RT aumentó de 28 a 40 horas en fermentadores mantenidos a un pH relativamente constante (6,56 y 6,44, respectivamente). Es posible que las diferentes condiciones en los dos tipos diferentes de fermentadores (fermentadores de doble flujo continuo en los estudios de Hoover *et al.* (1982, 1984) y Rusitec en nuestra prueba) hayan contribuido a las diferencias observadas.



Como conclusión de esta prueba, incrementar el DL de 3,78 a 5,42%/h en fermentadores Rusitec mantenidos a un pH similar aumentó la desaparición de la dieta, la producción de VFA y N amoniacal, y las actividades carboximeilcelulasa y xilanas del fluido ruminal, pero no afectó a la producción de metano ni al crecimiento microbiano. Estos resultados sugieren que el aumento del DL promovió cambios en las comunidades microbianas hacia comunidades de microorganismos con una mayor actividad proteolítica y fibrolítica. La reducción del RT del concentrado de 48 a 24 horas hizo disminuir la desaparición de la dieta, la producción de VFA y metano, y el flujo microbiano y la EMG, pero no afectó a la producción de N amoniacal o a la desaparición de la proteína, lo cual podría sugerir que el RT no afectó a los microorganismos proteolíticos. Para varias de las variables estudiadas hubo interacciones significativas DL x RT, indicando que los efectos del DL sobre la fermentación ruminal en fermentadores Rusitec pueden estar influidos por el RT. Finalmente, el aumento del DL y la reducción del RT del concentrado produjo proporciones más reducidas de caproico y menores relaciones acético:propiónico, de tal forma que los valores fueron más similares a los encontrados *in vivo*. Estos resultados indicarían que utilizando mayores DL y menores RT que los habitualmente empleados en fermentadores Rusitec, se podría contribuir a mejorar la simulación de la fermentación *in vivo* de las dietas HC.

Los fermentadores constituyen una herramienta especialmente útil para estimar la síntesis de proteína microbiana, ya que su cuantificación *in vivo* es complicada y costosa. Los métodos de estimación de la síntesis de proteína microbiana requieren el uso de marcadores microbianos, para diferenciar los componentes microbiano y alimentario del total de proteína que se recoge en los efluentes. A pesar de que existen diferencias entre las SAB y LAB en su relación marcador:N (Merry y Mc Allan, 1983; Carro y Miller, 2002; Molina-Alcaide *et al.*, 2008), en muchos estudios esta relación ha sido establecida en las LAB debido a que son las bacterias más fáciles de aislar. Sin embargo, la contribución de las SAB debe ser tenida en cuenta para determinar la síntesis de proteína microbiana, porque esta fracción puede constituir incluso más del 70% del flujo microbiano que abandona el rumen (Yang *et al.*, 2001; Ipharraguerre *et al.*, 2007). Pese a la falta de consenso acerca de cuál es el marcador “ideal” entre los existentes, para los trabajos de esta Tesis Doctoral elegimos el <sup>15</sup>N, basándonos en revisiones previas (Broderick y Merchen, 1992; Carro, 2001). Para analizar la relación marcador:N en las SAB es necesario desligarlas previamente de las partículas de

alimento a las que se encuentran adheridas. Los procedimientos comunes para desligar las SAB presentan diferentes eficiencias que oscilan entre el 20 y el 90%, pero la recuperación total de las SAB desligados suele ser inferior al 55% (Olubobokun y Craig, 1990; Martín-Orúe *et al.*, 1998; Ranilla y Carro, 2003), indicando que el pellet SAB puede no ser representativo de la comunidad real de esta fracción bacteriana. A pesar de la importancia de este punto, hasta el momento no se han realizado estudios que comparen diferentes procedimientos de desligamiento (DP) en su eficacia para obtener un pellet SAB representativo. Por ello se planteó que las técnicas moleculares de huella genética como la DGGE, t-RFLP o SSCP, que han sido utilizadas para estudiar la diversidad microbiana en el tracto digestivo, podrían servir para evaluar la similitud entre las comunidades microbianas ligadas al alimento y las del pellet SAB obtenido tras diferentes DP. La hipótesis de la cuarta prueba fue que el DP puede afectar a la composición de las comunidades microbianas de los pellets SAB, y por lo tanto a la relación marcador:N y a la estimación del crecimiento microbiano en los fermentadores. Para la prueba se seleccionó un tratamiento con una solución de metilcelulosa (MET) que previamente había mostrado buenos resultados (Ranilla y Carro, 2003) y se decidió compararlo con dos tratamientos físicos: stomacher (STO) y congelación previa al tratamiento con stomacher (FRE). El estudio se llevó a cabo en fermentadores Rusitec a los que se administró forraje (FOR) y concentrado (CON) en bolsas de nailon separadas, para probar la eficiencia de los DP en dos sustratos diferentes, debido a que ésta puede verse afectada por la naturaleza del sustrato (Olobobokun y Craig, 1990; Ranilla y Carro, 2003). Sin embargo, en esta prueba, no se encontraron interacciones significativas entre el DP y el tipo de sustrato para ninguna de las variables analizadas.

El tratamiento con STO ha sido considerado por algunos autores como un DP eficiente (Merry y Mc Allan, 1983), mientras que otros no han observado buenos resultados (Legay-Carmier y Bauchart, 1989; Trabalza-Marinucci *et al.*, 2005). Estas discrepancias podrían deberse a diferencias en el tipo de sustrato, comunidades microbianas y en el tiempo y la intensidad con el que se efectúa el tratamiento en el stomacher. En esta prueba, la eficiencia de desligamiento para el tratamiento STO fue 1,09 y 1,17 veces mayor que la obtenida con MET para el FOR y CON, respectivamente. Congelar la digesta antes de someterla al tratamiento STO (tratamiento FRE) no aumentó el porcentaje de desligamiento comparado con el STO o MET, lo que concuerda con los resultados de Trabalza-Marinucci *et al.* (2005), quienes indicaron que

congelando la digesta a -30°C durante 24 h antes del DP no mejoraba la eficacia del DP evaluado.

Los valores de recuperación de las SAB desligadas (89,0 - 92,0%) fueron mayores que los hallados en estudios previos (Craig *et al.*, 1987; Martín- Orúe *et al.*, 1998) y sugieren que los DP utilizados en esta prueba produjeron una menor lisis celular. La ausencia de diferencias entre los tres DP en estos valores podría indicar que los procedimientos utilizados no tienen un efecto adverso en la integridad celular de los microorganismos, o bien que estos se vieron afectados con la misma intensidad. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los componentes nitrogenados se localizan tanto en el citoplasma como en la pared celular, y por lo tanto la relación  $^{15}\text{N}:\text{N}$  puede no verse tan afectada por la lisis celular como en el caso de otros marcadores que se localizan únicamente en la pared celular, como es el ácido diaminopimélico o el ácido aminoetilfosfónico, o en el citoplasma, como ocurre con las bases púricas y pirimidínicas.

Los valores de recuperación total de las SAB variaron entre 58,9 y 65,7% para el FOR y entre 44,8 y 50,8% para el CON, siendo mayores para FOR que para CON con todos los DP. Estos valores son similares a los obtenidos por Ranilla y Carro (2003) para tres DP aplicados sobre la digesta de fermentadores Rusitec, pero mayores que los obtenidos por otros autores (Martín-Orué *et al.*, 1998; Craig *et al.*, 1987; Olobobokun *et al.*, 1998) cuando utilizaron distintas soluciones de extracción para desligar SAB de la digesta ruminal tomada de ovejas, terneros o vacas alimentadas con diferentes dietas a distintas horas tras la administración del alimento. Un factor que podría ayudar a explicar la mayor recuperación total observada en los estudios hechos con fermentadores Rusitec en relación a aquellos realizados *in vivo* es el momento del muestreo. En los fermentadores Rusitec, las bolsas de nailon con el alimento se retiran cada 48 h, y el grado de adherencia de las SAB a las partículas de alimento puede ser menos tenaz en este momento que al poco tiempo de la ingestión (Leedle *et al.*, 1982). En concordancia con esta hipótesis, Craig *et al.* (1987) y Olobobokun y Craig (1990) observaron que la proporción de SAB recuperadas de la digesta ruminal de vacas se incrementó con el tiempo tras la ingestión, con los mayores valores observados entre 1 y 3 h tras la administración del alimento.

Las LAB presentaron mayor contenido en N (69,6 mg/ g MS) y enriquecimiento en  $^{15}\text{N}$  (0,2547 átomos, % en exceso) que las SAB, lo cual concuerda con estudios previos (Merry y McAllan, 1983; Carro y Miller, 2002). El uso de los diferentes DP afectó a la

relación  $^{15}\text{N}:\text{N}$  en los pellets y, por ello, a la estimación de la síntesis del crecimiento microbiano. Las estimaciones de la cantidad de SAB sintetizada con el tratamiento STO fueron 1,13 y 1,22 veces mayores que las obtenidas con MET para FOR y CON, respectivamente. No se encontraron diferencias en la síntesis de SAB entre los tratamientos STO y FRE para el FOR, pero los valores para el CON fueron 1,13 veces mayores para STO que con el tratamiento FRE. Las SAB constituyeron casi el 45% del total de N microbiano sintetizado diariamente en los fermentadores, por lo que su contribución debe ser tenida en cuenta en todos los estudios para estimar la síntesis de proteína microbiana.

Aunque la eficiencia de desligamiento del tratamiento MET fue menor que para STO, los pellets obtenidos con MET presentaron los mayores índices de similitud con las comunidades bacterianas adheridas al sustrato, con valores medios de 84,0 y 86,4% para FOR y CON, respectivamente. El tratamiento FRE produjo los menores índices de similitud (72,5 y 67,8%, respectivamente), lo que sugiere que la congelación pudo haber destruido la integridad celular de algunas especies bacterianas, reduciendo así la diversidad microbiana en los pellets. Los datos obtenidos podrían indicar que MET puede ser considerado el procedimiento más apropiado de los tres analizados para tratar la digesta de fermentadores Rusitec, y debido a esto fue el método de elección para el resto de las pruebas experimentales. De lo anteriormente expuesto, se deduce que el porcentaje de desligamiento y recuperación no deben ser usados como único criterio para evaluar un DP, y son necesarias futuras investigaciones que combinen los métodos MET y STO para desarrollar un DP eficiente que produzca pellets altamente representativos de las comunidades microbianas ligadas a la digesta. Además, los resultados de esta prueba sugieren que el DP utilizado para aislar SAB afecta a las estimaciones de la síntesis de proteína microbiana y podría influir en la interpretación de los resultados cuando se comparan dietas con diferente relación F:C.

Los estudios que comparan directamente la fermentación ruminal *in vivo* con la producida en sistemas *in vitro* son escasos en la bibliografía, pese a que es necesario determinar hasta qué punto los sistemas *in vitro* son capaces de reproducir los patrones de fermentación y las comunidades microbianas existentes *in vivo*. Además, los trabajos realizados hasta el momento se han llevado a cabo en su mayor parte con fermentadores de flujo continuo (Mansfield *et al.*, 1995; Ziemer *et al.*, 2000; Muetzel *et al.*, 2009) o BCRM (Gizzi *et al.*, 1998) y apenas hay estudios realizados con fermentadores Rusitec. En estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio (Gómez *et al.*, 2005; Carro *et*

al., 2009) se observó que los cambios en la fermentación promovidos por cambios en la relación F:C de la dieta en fermentadores Rusitec no reproducían los encontrados *in vivo*, principalmente cuando las dietas tenían una elevada proporción de concentrado. En la tercera prueba realizada, se observó que el aumento del DL de 3,78 a 5,42%/ h y la disminución del tiempo de retención del concentrado de 48 a 24 h en fermentadores Rusitec que recibían una dieta con alto contenido en concentrado disminuyó la relación acético:propiónico y la proporción de caproico a niveles más fisiológicos de los hallados previamente, por lo que se planteó la hipótesis de que la utilización de estas condiciones de manejo en fermentadores Rusitec podría contribuir a mejorar la simulación de la fermentación *in vivo* de dietas con una alta proporción de concentrado. Para validar el uso del Rusitec como un modelo fiable para el estudio de la fermentación ruminal de dietas de calidad variable son necesarias comparaciones experimentales, y por ello, el objetivo de la quinta prueba fue determinar la capacidad de los fermentadores Rusitec para detectar los cambios en la fermentación ruminal, el crecimiento microbiano y las comunidades microbianas promovidos por la administración de dietas de calidad variable a las ovejas. Para ello, se utilizaron las 4 dietas descritas con anterioridad, que fueron administradas a 4 ovejas canuladas en el rumen y el duodeno y a ocho fermentadores Rusitec. Los efectos de la relación F:C y del tipo de forraje se analizaron independientemente en cada sistema, y posteriormente se compararon los resultados.

Los fermentadores Rusitec detectaron diferencias entre dietas similares a las observadas en ovejas al cambiar la relación F:C en los siguientes parámetros: pH, digestibilidad de la fibra neutro detergente, la concentración del total de VFA y las proporciones molares de la mayoría de VFA. Por el contrario, los fermentadores no detectaron diferencias similares en otros parámetros, como la concentración de NH<sub>3</sub>-N y láctico, la digestibilidad de la materia seca, las actividades carboximetilcelulasa y xilanasa y el crecimiento microbiano y su eficiencia. Aunque los resultados indican que los fermentadores Rusitec detectaron efectos de la relación F:C en el pH y las proporciones de los principales VFA similares a los observados en las ovejas, la evolución del patrón de fermentación fue distinto en ambos sistemas. La concentración del total de VFA en el fluido ruminal se incrementó rápidamente tras la ingestión en las ovejas, alcanzando valores máximos 2 h tras la ingestión, pero en los fermentadores se incrementó gradualmente, alcanzando valores máximos 6-8 h tras la administración del alimento, mientras que los valores de pH siguieron una evolución inversa en los dos sistemas. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el manejo del Rusitec, donde

cada día dos bolsas con el alimento no digerido son retiradas, con lo que una parte considerable de la masa microbiana es eliminada del sistema. En el rumiante, la comida que entra en el rumen es colonizada rápidamente por los microorganismos y la colonización termina o disminuye cuando ya no hay puntos libres para la adherencia o se agota el sustrato (Cheng y McAllister, 1997). En el sistema Rusitec, los microorganismos contenidos en la bolsa de nailon que lleva un día en su interior y que permanece en él, así como los de la fase líquida, tienen que alcanzar el nuevo alimento introducido y colonizarlo, y esto puede explicar el retraso en el aumento de las concentraciones de VFA observadas en los fermentadores comparadas con las ovejas. Además, hay que tener en cuenta que los fermentadores Rusitec se abren cada día para introducir nuevas bolsas de nailon con alimento, y esta operación expone a los microorganismos ruminales al oxígeno, lo que supone un estrés sustancial para los anaerobios estrictos (Gizzi *et al.*, 1998).

La concentración del total de VFA y las proporciones molares de acético, propiónico, butírico, isovalérico y caproico no se vieron afectadas por la relación F:C en las ovejas ni en los fermentadores. Esto concuerda con la ausencia de efecto de la relación F:C en la digestibilidad ruminal de la materia seca en los fermentadores, pero contrasta con la menor digestibilidad observada en las ovejas que recibieron las dietas HC. Mientras que en los fermentadores no hay absorción, y por lo tanto la concentración de VFA debe estar directamente relacionada con la cantidad de materia seca digerida (siempre y cuando el ritmo de dilución sea similar en todos los fermentadores), en las ovejas las concentraciones de VFA no reflejan necesariamente su producción, debido a que existe absorción y paso a tramos posteriores del tracto digestivo.

En lo referente a las actividades enzimáticas, tanto *in vivo* como en los fermentadores se detectó un aumento en la actividad amilasa debida a la disminución de la relación F:C, de acuerdo con otros autores (Martin y Michalet-Doreau, 1995; Hristov *et al.*, 2001). Por el contrario, en los fermentadores no se detectaron diferencias entre dietas en las actividades carboximetilcelulasa y xilanasas, mientras que *in vivo* estas actividades fueron mayores para las dietas HC, quizás debido a que el pH ruminal no descendió nunca de 5,8. Esto contrasta con la menor digestibilidad de la NDF observada en las dietas HC, pero hay que tener en cuenta que la actividad fibrolítica en la fase líquida del rumen es muy baja en comparación con la de la digesta sólida (Cheng y McAllister, 1997), y que las diferencias entre ambas fases pueden ser más pronunciadas

en el Rusitec, debido a que existe una mayor compartimentalización que en el rumen. Los fermentadores no reprodujeron las diferencias debidas a la relación F:C encontradas *in vivo* en la concentración de láctico, que fue mayor en las ovejas que recibían las dietas HC comparada con las que consumían HF. Las concentraciones de láctico en el rumen de las ovejas fueron más bajas que las observadas por otros autores (Mackie *et al.*, 1978; Brossard *et al.*, 2003), probablemente debido al moderado nivel de alimentación y a la naturaleza fibrosa del concentrado, que impidió el rápido descenso en el pH característico en animales que reciben grandes cantidades de granos de cereales. Un aspecto importante en la utilización de sistemas *in vitro* es la determinación de la síntesis de proteína microbiana, dadas las dificultades que conlleva su determinación *in vivo*. Sin embargo, los fermentadores no simulaban las diferencias observadas entre dietas en el crecimiento microbiano y su eficiencia. El flujo duodenal de N microbiano en las ovejas fue mayor para las dietas HC comparado con las HF, lo que puede ser parcialmente explicado por la mayor ingesta de energía y N, dado que la producción microbiana está relacionada con la cantidad de N y energía disponibles. Por el contrario, en los fermentadores las dietas HF promovieron un mayor crecimiento microbiano comparadas con las HC. Este hecho es difícil de explicar, pero pudo deberse a que la colonización bacteriana de la digesta sólida fue mayor para las dietas HF que para las HC debido al mayor tiempo de retención del forraje comparado con el del concentrado (48 vs. 24 h). Como consecuencia, el crecimiento de las SAB fue mayor en los fermentadores que recibían las dietas HF comparado con los que recibían dietas HC.

Los valores de la eficiencia de síntesis microbiana expresados como N microbiano por kg de materia orgánica aparentemente fermentada en el rumen de las ovejas fueron más bajos para las dietas HF que para las HC. Por el contrario, este valor fue menor en los fermentadores que recibían las dietas HC comparados con los que recibían las dietas HF, debido presumiblemente al mayor crecimiento microbiano en los fermentadores HC y a la ausencia de diferencias entre las dietas HC y HF en lo referente a la cantidad de materia orgánica fermentada. En las ovejas, la dieta HFG presentó la menor eficiencia de síntesis microbiana, probablemente debido a una limitación del crecimiento microbiano causada por el bajo contenido en N en la dieta. Sin embargo, esto no se observó en los fermentadores, pese a que los valores de NH<sub>3</sub>-N fueron los más bajos para los fermentadores HFG.

El Rusitec detectó diferencias debidas a la calidad del forraje similares a las encontradas en las ovejas para la mayoría de los parámetros determinados, con la

excepción del pH, la digestibilidad de la materia seca, la proporción de butírico y la actividad carboximetilcelulasa. En lo que se refiere al pH, hay que tener en cuenta que en las ovejas la calidad de forraje influye en la actividad ruminatoria, en la tasa de digestión y en la producción de saliva, factores implicados en la regulación del pH ruminal, que no pueden ser simulados en los fermentadores. La digestibilidad de la NDF fue 1,1 veces mayor para las dietas que contenían heno de gramíneas que para las que contenían heno de alfalfa en ambos sistemas, lo que es consistente con la idea de que la fibra de las gramíneas es más digestible que la de las leguminosas. Las concentraciones totales de VFA fueron 1,1 veces mayores para las dietas con heno de alfalfa en ambos sistemas, que también detectaron diferencias similares debidas al tipo de forraje en los VFA, a excepción de la proporción de butírico. El tipo de forraje no afectó a la proporción de acético ni a la de caproico en ninguno de los dos sistemas, pero las proporciones de propiónico, isobutírico, isovalérico y valérico fueron mayores para las dietas con heno de alfalfa comparadas con las de heno de gramíneas, lo cual pudo deberse a una mayor degradación proteica en las dietas con alfalfa, dado que estos VFA se producen en la fermentación de los aminoácidos de cadena ramificada.

Los más bajos niveles de  $\text{NH}_3\text{-N}$  observados en ambos sistemas para las dietas que contenían heno de gramíneas podrían deberse a una menor ingestión de N, o también a una menor degradación proteica comparada con las dietas con heno de alfalfa. El mayor contenido en energía y N en las dietas con alfalfa comparadas con las que contenían heno de gramíneas puede explicar el mayor crecimiento microbiano observado en ambos sistemas para las dietas que contenían alfalfa.

En general, existieron diferencias entre los valores observados en el rumen de las ovejas y los medidos en los fermentadores para la mayoría de los parámetros. Los fermentadores mostraron menores concentraciones de láctico, digestibilidad de la NDF, relación acético:propiónico y actividades enzimáticas, y mayores concentraciones de  $\text{NH}_3\text{-N}$ , digestibilidad de la materia seca y proporciones de propiónico, butírico, isovalérico, valérico y caproico que las ovejas. Las diferencias observadas entre los dos sistemas pueden atribuirse principalmente a la ausencia de absorción en los fermentadores, a las diferencias en el tiempo de retención del sólido, a la mayor compartimentalización que existe en el Rusitec en comparación con el rumen *in vivo*, y a diferencias en las comunidades microbianas. Los fermentadores Rusitec simularon mejor la fermentación de las dietas HF que la de las dietas HC.



Para analizar las posibles diferencias entre las comunidades microbianas en el rumen de las ovejas y en los fermentadores, se realizaron recuentos de bacterias totales y celulolíticas, recuento e identificación de protozoos y se analizó la diversidad de pellets LAB y SAB mediante el análisis automatizado de la región espaciadora intergénica ribosomal (ARISA). El número total de bacterias fue mayor en el rumen de las ovejas alimentadas con dietas HF comparado con las que recibieron las dietas HC, mientras que los fermentadores que recibían las dietas HF tuvieron concentraciones más bajas que los que recibían las dietas HC. Esto contrasta con el menor flujo de N microbiano observado en los fermentadores HC, pero debe tenerse en cuenta que el número total de bacterias se determinó en el fluido ruminal, y las SAB pueden constituir una fracción muy importante del total de bacterias en el rumen. Esto también podría explicar porqué las ovejas alimentadas con dietas HC tuvieron mayores flujos microbianos que las HF, pero menores concentraciones de bacterias totales en el fluido ruminal.

El número de bacterias celulolíticas no se vio afectado por la relación F:C en las ovejas ni en el Rusitec, lo cual concuerda con anteriores resultados *in vivo* (Mackie *et al.*, 1978; Leedle *et al.*, 1986). En estudios realizados con fermentadores de flujo continuo (Mansfield *et al.*, 1995; Muetzel *et al.*, 2009) se observó que el número de bacterias celulolíticas era mayor en el rumen que en los fermentadores, lo que concuerda con nuestros resultados. Ni el número de bacterias totales ni el de celulolíticas fueron afectados por el tipo de forraje en el rumen ni en los fermentadores. No existieron interacciones F:C x FOR en las comunidades bacterianas ni protozoarias en ninguno de los dos sistemas, lo cual indica que los cambios en las comunidades microbianas en respuestas al aumento en la cantidad de concentrado no se vieron influidas por el tipo de forraje en la dieta.

El número total de protozoos estuvo en el rango del observado previamente en el fluido ruminal de ovejas (Santra *et al.*, 1998; Brossard *et al.*, 2004) y en fermentadores Rusitec alimentados con dietas de diferente calidad (Carro *et al.*, 1992, 1995). La concentración total de protozoos en el fluido ruminal generalmente aumenta al añadir concentrado a las dietas forrajeras (Franzolin y Dehority, 1996; Brossard *et al.*, 2003), lo cual concuerda con nuestros resultados en las ovejas. Por el contrario, la relación F:C no tuvo efecto en la cantidad total de protozoos en los fermentadores. El secuestro de los protozoos entre la masa sólida de la digesta es un factor importante para el mantenimiento de las comunidades protozoarias en los fermentadores (Nakamura y

Kurihara, 1978), y el Rusitec tiene un flujo semicontinuo de partículas que permite una mejor retención de los protozoos comparado con otros tipos de fermentadores. En este estudio, se utilizó un tiempo de retención de la digesta sólida diferente para forraje y concentrado (48 y 24 h, respectivamente), lo cual implica que el tiempo de retención para las dietas HC fue menor que para las dietas HF, y esto pudo haber contribuido a la ausencia de diferencias entre los fermentadores HF y HC en el número de protozoos. De acuerdo con datos previos en ovejas (Santra *et al.*, 1998; Dehority, 2003), los Entodiniinae representaron el 86 y el 92% de los protozoos totales en las ovejas alimentadas con dietas HF y HC, respectivamente, y el 97 y el 100% en los fermentadores, lo que también concuerda con otros estudios realizados previamente (Slyter y Putnam, 1967; Carro *et al.*, 1992, 1995). El cambio en la relación F:C no afectó al número de Isotrichidae y Ophryoscolecinae en las ovejas, pero ambos grupos desaparecieron completamente de los fermentadores que recibían las dietas HC. Tanto el número total de protozoos como el número de Entodiniinae fueron mayores en las ovejas que recibían las dietas con heno de alfalfa que en las que recibían las dietas con heno de gramíneas, mientras que en los fermentadores ocurrió lo contrario. La administración de dietas HC no tuvo efectos negativos en ninguno de los grupos de protozoos identificados en el rumen; por el contrario, los Isotrichidae y los Diplodiniinae desaparecieron completamente en los fermentadores alimentados con dietas HC, aunque se mantuvieron en los que recibían las dietas HF. La desaparición completa de los Isotrichidae en los fermentadores HC puede estar relacionada con el pH; mientras que en los fermentadores que recibían las dietas HF los valores de pH no descendieron por debajo de 6,44 y 6,11 en los alimentados con la dieta HFA y HFG, respectivamente, los valores mínimos fueron de 5,76 y 5,74 en los fermentadores que recibían las dietas HCA y HCG, respectivamente. La desaparición de los Ophryoscolecinae de todos los fermentadores puede ser parcialmente explicada por su largo tiempo de generación y su gran tamaño. El tiempo de retención de la digesta sólida en los fermentadores fue de 24 y 48 h para el concentrado y el forraje, respectivamente, y este tiempo es menor que el tiempo de generación de hasta 3 días que se ha observado para los Ophryoscolecinae (Sylvester *et al.*, 2009). Este grupo es, además, uno de los más grandes protozoos ruminales, con tamaños que pueden superar las 200  $\mu\text{m}$  de longitud (Williams *et al.*, 1961). El tamaño de poro de las bolsas de nylon usadas en el Rusitec (100  $\mu\text{m}$ ) probablemente limitó la entrada de este grupo y su adhesión al alimento sólido contenido en las bolsas.

Tanto los protozoos totales como los Entodiniinae fueron más numerosos en las ovejas que recibían las dietas con heno de alfalfa comparados con los que recibían las dietas con heno de gramíneas. Por el contrario, los fermentadores que recibieron las dietas con heno de alfalfa tuvieron menores concentraciones de protozoos totales, así como de Entodiniinae que los fermentadores alimentados con las dietas que contenían heno de gramíneas. Estos resultados parecen indicar que los protozoos se retuvieron con mayor éxito en los residuos no fermentados del heno de gramíneas que en los del heno de alfalfa, como ya había sido observado por Abe y Kurihara (1984). El tipo de forraje en la dieta no afectó a los números de Isotrichidae, Diplodiniinae ni Ophryoscolecinae en las ovejas, pero los Diplodiniinae fueron más abundantes en los fermentadores que recibían heno de alfalfa comparados con los que recibían heno de gramíneas. Los resultados indican que, bajo las condiciones de esta prueba, las comunidades protozoarias en los fermentadores Rusitec no fueron representativas de las existentes en el rumen de ovejas que habían recibido las mismas dietas.

En los últimos años se han usado varias técnicas moleculares para analizar la diversidad de las comunidades microbianas del rumen. En este trabajo elegimos la técnica ARISA para analizar la diversidad en pellets LAB y SAB aislados del rumen y de los fermentadores debido a que es un método rápido y efectivo para determinar la diversidad microbiana (Fisher y Triplett, 1999) y permite un análisis rápido de un gran número de muestras. Esta técnica ha sido recientemente utilizada para monitorizar los cambios en las bacterias (Welkie *et al.*, 2009) y los hongos ruminales (Denman *et al.*, 2008), y para analizar la representatividad de los pellets SAB aislados a partir de la digesta ruminal (Ramos *et al.*, 2009).

El número de picos detectados en los electroferogramas del ARISA en los pellets aislados del rumen de las ovejas fue de 24 a 52 para las LAB y de 23 a 77 para las SAB, con un total de 168 filotipos, mientras que en los fermentadores varió de 23 a 84 para las LAB y de 18 a 77 para las SAB, con un total de 162 filotipos. La relación F:C en la dieta no afectó ni al número de filotipos ni al índice de Shannon de las LAB aisladas del rumen de las ovejas y de los fermentadores. En el caso de las SAB, ambas variables fueron mayores para las aisladas de las ovejas alimentadas con dietas HF, pero en los fermentadores no se observaron diferencias. No existieron diferencias en el número de filotipos ni en el índice de Shannon entre las LAB y SAB aisladas del rumen de las ovejas, pero en los fermentadores las LAB presentaron un mayor número de picos y

mayores valores del índice de Shannon, lo que indicaría una mayor diversidad que en los pellets SAB.

En el análisis de los dendogramas realizados para cada tipo de pellet dentro de cada sistema, se observó que las comunidades bacterianas de las SAB aisladas de los fermentadores se dividieron claramente en dos grupos distintos en función del forraje utilizado como sustrato. Dentro de cada tipo de forraje, las comunidades bacterianas se agruparon en función de la relación F:C para ambos forrajes. Estos resultados indican que el factor que más influyó en la estructura de las comunidades bacterianas de las SAB en los fermentadores fue el tipo de forraje de la dieta, y dentro de cada tipo de forraje, la proporción del mismo. Sin embargo, al analizar los perfiles de las comunidades de las LAB, las diferencias parecieron estar más relacionadas con la relación F:C que con el tipo de forraje. Así, los pellets LAB de las dietas HC se agruparon en un solo cluster, en dos grupos diferentes para cada tipo de forraje. Los pellets LAB de las dietas HF siguieron un esquema similar de agrupamiento, aunque dos de los pellets de la dieta con heno de alfalfa se situaron en un grupo más alejado. En este sentido, la estructura de las comunidades bacterianas de las LAB se vio afectada por la relación F:C de la dieta, aunque el tipo de forraje también influyó en el perfil de dichas comunidades.

En el rumen de las ovejas, las SAB siguieron una tendencia de agrupamiento similar a la observada en los fermentadores, es decir, la mayoría de los pellets de las ovejas que recibían heno de alfalfa formaron un cluster y la mayoría de los aislados de las ovejas que recibían heno de gramíneas formaron otro, si bien no se observó efecto aparente de la relación F:C. En cuanto a los pellets LAB, no se observó ningún patrón claro de agrupamiento.

Cuando todos los pellets se analizaron de forma conjunta, el análisis de componentes principales mostró dos agrupamientos claros, un cluster formado por todas las muestras *in vivo* y otro por las muestras de los fermentadores. El eje 1 explicó el 24,4% de la varianza, y el eje 2 el 8,8%, lo que da una idea de la complejidad de factores implicados en la estructura de las comunidades bacterianas ruminales. Las diferencias entre las comunidades microbianas existentes en el rumen de las ovejas y las que se desarrollan en los fermentadores pueden deberse a múltiples factores, algunos de los cuales han sido mencionados anteriormente.

Los cultivos discontinuos de microorganismos ruminales (BCRM) representan una alternativa *in vitro* a los experimentos *in vivo*, aunque para realizarlos siga siendo

necesario fluido ruminal obtenido de un animal donante. La actividad microbiana del inóculo, así como sus características fisicoquímicas, pueden variar dependiendo de la dieta del animal donante y de la disponibilidad de nutrientes (Mould *et al.*, 2005), dado que estos factores influyen en las comunidades microbianas y la fermentación ruminal (Weiss, 1994; Huntington *et al.*, 1998). Por ello, las características del inóculo afectarán a la fermentación *in vitro* de un determinado sustrato (Mould *et al.*, 2005). En los animales que reciban dietas con elevado contenido en forraje habrá una mayor proporción de microorganismos celulolíticos, mientras que en los que reciban dietas con elevados contenidos en concentrado predominarán los microorganismos amilolíticos (Demeyer y Fievez, 2000). Sin embargo, el grado en el que el concentrado afecta a la digestión de la fibra puede depender de la naturaleza y proporción de este, así como de la calidad del forraje (Matejovsky y Sanson, 1995; Archimède *et al.*, 1997). Algunos estudios han puesto de manifiesto la influencia de la dieta de los animales donantes sobre la producción de gas (Menke y Steingass, 1988; Nagadi *et al.*, 2000) y la degradabilidad del sustrato incubado (Nagadi *et al.*, 2000; Tejido *et al.*, 2002). Sin embargo, no existen estudios acerca del efecto del tipo de inóculo sobre la producción de metano *in vitro*.

La producción de metano en el rumen disminuye la eficiencia energética del animal y contribuye al efecto invernadero y a la destrucción de la capa de ozono (Moss *et al.*, 2000), por lo que resulta especialmente interesante reducir la metanogénesis. La producción de metano se ve afectada por numerosos factores, como el tipo de dieta y el pH ruminal; por ejemplo, Demeyer y Fievez (2000) observaron que los animales alimentados con dietas basadas en concentrado presentaban un menor número de metanógenos en el rumen que animales alimentados a base de forrajes. Nuestra hipótesis de trabajo fue que la dieta administrada a los animales donantes podría afectar a la producción de metano *in vitro*, y por ello el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la relación F:C y la calidad del forraje en la dieta de los animales donantes sobre la producción de metano y la fermentación del sustrato en BCRM. Para el estudio se utilizaron las cuatro dietas usadas en los experimentos anteriores, que se administraron a seis ovejas provistas de una cánula ruminal en un diseño de cuadrado latino replicado parcialmente. En cada uno de los 4 periodos, el fluido ruminal de cada oveja se utilizó para inocular BCRM que contenían 400 mg de sustrato, y tras 24 horas de incubación se midieron los principales parámetros de fermentación ruminal. Como sustratos se utilizaron las cuatro dietas administradas a las ovejas.

En esta prueba no se observaron interacciones F:C x FOR para ninguna de las variables estudiadas. Los efectos de la relación F:C en la dieta de las donantes sobre el pH y la producción de gas observados concuerdan con los obtenidos en trabajos previos (Cone *et al.*, 1996; Menke y Steingass, 1988; Nagadi *et al.*, 2000). Cuando se incubaron los sustratos HFA y HCG, el inóculo procedente de ovejas alimentadas con dietas HC redujo el pH final; además, para todos los sustratos, la producción de gas a las 8 y 24 horas de incubación fue mayor con el inóculo HC comparado con el HF. Estos resultados podrían indicar que los sustratos inoculados con fluido ruminal de ovejas alimentadas con dietas HC sufrieron una mayor fermentación que aquellos inoculados con HF, ya que la cantidad de gas producido tiene una relación directa con la cantidad de sustrato fermentado (Menke y Steingass, 1988). La producción total de VFA fue 8,3 y 11,9% mayor para el inóculo HC cuando se incubaron los sustratos que contenían A y G, respectivamente. Esto concuerda con las observaciones de Kamel *et al.* (2008), y podría indicar mayores concentraciones microbianas o una mayor actividad de estas en el fluido ruminal de las ovejas que recibieron las dietas HC. Dado que la cantidad de VFA producidos en cada cultivo se calculó sustrayendo la cantidad que estaba presente inicialmente en el medio de incubación de la determinada al final del periodo, los VFA sólo pueden provenir de la fermentación del sustrato. Además, el fluido ruminal se recogió justo antes de alimentar a las ovejas con el fin de minimizar la cantidad de sustrato fermentable presente en el inóculo. Adicionalmente, las actividades carboximetilcelulasa, amilasa y xilanasas fueron 1,7, 1,6 y 2,9 veces mayores en el fluido ruminal proveniente de las ovejas que recibían dietas HC en comparación con aquellas que recibían dietas HF, y esto apoya la hipótesis de que el inóculo HC tenía unas comunidades microbianas más activas. Un factor que pudo haber contribuido a la mayor actividad del inóculo HC pudo ser la mayor concentración de protozoos observada en el fluido ruminal de los animales que recibían dietas HC. Las diferencias observadas entre ambos inóculos (HC y HF) en la cantidad de butírico y otros VFA podrían también indicar diferencias en las comunidades microbianas.

La proporción de metano en el total de gas aumentó con el tiempo de incubación, con valores medios de 5,0 y 5,3% después de 8 h de incubación para el inóculo HC y HF, respectivamente, y de 8,7 y 9,8% después de 24 h de incubación. Tal y como indicaron Getachew *et al.* (2005), esto sugiere que la fracción lentamente digestible del alimento (los carbohidratos estructurales) está asociada con una mayor producción de metano. La proporción de metano en el gas producido tras 8 h de incubación no se vio

afectada por la relación F:C en la dieta de las donantes con ninguno de los sustratos incubados, pero tras 24 h de incubación la cantidad de este gas fue 1,2 veces mayor con el inóculo HC (33,0 y 37,7 mL/g MS para los sustratos HF incubados con inóculo HF y HC respectivamente, y 38,7 y 44,4 mL/g MS para los sustratos HC incubados con inóculo HF y HC, respectivamente). Como consecuencia de la mayor producción de gas y la mayor proporción de metano en este, la producción de metano tras 24 h de incubación se incrementó en un 17,5% utilizando inóculo HC comparado con el HF.

Nuestros resultados para los sustratos HF concuerdan con valores *in vitro* (Getachew *et al.*, 2005), en ovejas (Moss, 2002) y en ganado vacuno (Yan *et al.*, 2006). Sin embargo, los valores de metano obtenidos cuando se incubaron los sustratos HC fueron mayores. Esto contrasta con trabajos *in vivo* en los que se observó que la reducción de la proporción de forraje en la dieta conllevaba una reducción significativa en la producción de metano expresada por unidad de MS ingerida (Moss *et al.*, 1995; Lovett *et al.*, 2003), debido a un cambio en el patrón de fermentación hacia la producción de propiónico y un descenso en el pH (Van Kessel y Russell, 1996). Russell (1988) mostró que la producción de metano *in vitro* desciende drásticamente a pH por debajo de 6,3. En nuestro estudio, los valores finales de pH en los BCRM estuvieron siempre por encima de 6,6, y esto pudo haber contribuido a la mayor producción de metano observada en los sustratos HC comparados con los HF.

La mayor producción de metano observada en los BCRM inoculados con fluido ruminal HC contrasta también con la observación de que los rumiantes alimentados con dietas concentradas contienen pocos metanógenos en el rumen en comparación a aquellos rumiantes alimentados con dietas ricas en forrajes (Van Kessel y Russell, 1996; Demeyer y Fievez, 2000). Sin embargo, la naturaleza altamente fibrosa del concentrado utilizado en este experimento (con un 33,5% de NDF y sólo un 32,0% de granos de cereales) impidió posiblemente una rápida caída del pH, que suele ser característica cuando se administran elevadas cantidades de cereales y que inhibe la actividad de las arqueas metanogénicas. Además, el hecho de que los animales recibieran dietas mixtas pudo haber reducido también los efectos negativos del pH que se observan habitualmente en la fermentación de las dietas HC, dado que las dietas mixtas tienden a minimizar las variaciones diarias en el pH del rumen. De hecho, en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio (Ramos *et al.*, 2008) se observó que la abundancia relativa de metanógenos en el fluido ruminal de las ovejas que recibían las dietas HC

utilizadas en esta prueba era 6,5 veces mayor que en las ovejas que recibían las dietas HF.

El tipo de forraje en la dieta de las ovejas donantes afectó significativamente a la mayoría de los parámetros, excepto al pH final. Para todos los sustratos incubados, tanto la cantidad de gas como de metano producida a las 8 y a las 24 horas de incubación fue mayor con el inóculo de las ovejas que recibían dietas con A comparadas con las que recibían dietas con G. En general, los rumiantes alimentados con dietas de alta calidad producen menos metano que aquellos alimentados con dietas menos digestibles (Pinares-Patiño *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2006), dado que una baja proporción de carbohidratos estructurales ocasiona una menor producción de este gas (Moe y Tyrrell, 1979). En nuestro estudio, se incubaron los mismos sustratos con todos los inóculos, y dado que los valores de pH en los BCRM no se vieron afectados por el tipo de forraje en la dieta, el único factor que podría explicar la mayor producción de metano observada para todos los sustratos en los BCRM inoculados con fluido ruminal de ovejas alimentadas con dietas A es la presencia de diferentes comunidades microbianas en ambos tipos de inóculo (A y G). Por otra parte, el número de protozoos fue 1,3 veces mayor en el inóculo A comparado con el G, y se ha observado que *in vitro* la producción de metano aumenta al aumentar las comunidades protozoarias en el fluido ruminal que se usa como inóculo (Newbold *et al.*, 1995). Además, Ramos *et al.* (2008) observaron que la abundancia relativa de metanógenos en el fluido ruminal de ovejas alimentadas con la dieta HFA era 1,7 veces mayor que en el rumen de aquellas que recibían las dietas HFG, y 1,2 veces mayor en las ovejas alimentadas con la dieta HCA comparadas con las que recibían la dieta HCG.

Otro mecanismo diferente que podría ayudar a explicar la mayor producción de metano observada con el inóculo A podría ser una mayor producción de hidrógeno en los BCRM inoculados con las dietas A. Las actividades carboximetilcelulasa y amilasa fueron 1,3 y 1,1 veces mayores con el inóculo A comparadas con el G, respectivamente, y una mayor actividad fibrolítica resulta en una mayor producción de acético, tal y como se observó en los BCRM inoculados con fluido ruminal de las ovejas que recibían las dietas A. El acético es el VFA predominante en la fermentación ruminal, y está muy relacionado con la producción de hidrógeno; por lo tanto, es de esperar que un aumento en la producción de acético produzca una mayor cantidad de hidrógeno disponible para los metanógenos. En esta prueba la producción de metano tras 24 h de incubación



estuvo positivamente relacionada con la producción de acético, y negativamente con la de propiónico.

Varios estudios (Pinares-Patiño *et al.*, 2003; Waghorn *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2006) han puesto de manifiesto una importante variación entre animales rumiantes de la misma especie en la emisión de metano por unidad de alimento ingerido. En este experimento se observó que la producción de metano para cada dieta y sustrato fue bastante consistente en los BCRM inoculados con fluido ruminal proveniente de las ovejas nº 1, 4, 5 y 6, con un valor medio a las 24 h de incubación para todas las dietas y sustratos de 677  $\mu\text{mol}$  y un coeficiente de variación del 8,8%. Los valores medios para las ovejas nº 2 y 3 fueron de 552 y 858  $\mu\text{mol}$ . Cuando se juntaron los datos de las 6 ovejas, el valor medio (686  $\mu\text{mol}$ ) fue similar al obtenido con las 4 primeras ovejas mencionadas, pero el coeficiente de variación aumentó hasta un 15,5%. Dado que el estudio se condujo *in vitro*, las diferencias entre BCRM inoculados con fluido proveniente de diferentes ovejas que recibían la misma dieta sólo puede atribuirse a diferencias en las comunidades microbianas del inóculo. Nuestros resultados apoyan las observaciones previas que indican la considerable variación en la cantidad de metano producida entre animales individuales. Además, estas variaciones entre animales se observaron también en la recuperación de hidrógeno, con valores medios de 77, 77, 89, 90, 83 y 83% para las ovejas nº 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente. Estos valores estuvieron en el rango de los encontrados previamente en otros estudios con BCRM (Carro y Ranilla, 2003; García-Martínez *et al.*, 2005).

En conclusión, los resultados indican que para todos los sustratos la producción de metano *in vitro* se incrementó al disminuir la relación F:C en la dieta de las ovejas donantes, y cuando estas recibían heno de alfalfa en comparación con las que recibían heno de gramíneas. Estos factores deberían tenerse en cuenta al realizar experimentos *in vitro*.



*Capítulo 6*  
*Conclusiones*  
**Conclusions**



1. En un experimento diseñado para analizar la evolución de los parámetros de fermentación en fermentadores Rusitec a lo largo de 14 días de incubación se observó que, bajo las condiciones del estudio, fueron suficientes 6 días para alcanzar valores estables en la mayoría de los parámetros de fermentación. En general, los fermentadores manejados con un ritmo de dilución elevado se estabilizaron antes que los operados a un bajo ritmo de dilución.
2. Después de 14 días de incubación de cuatro dietas diferentes en fermentadores Rusitec, no fue posible mantener cifras de protozoos similares a las del rumen, aunque estuvieron presentes en todos los fermentadores. Al final de la prueba, sólo los Entodiniinae fueron capaces de mantenerse en los fermentadores que recibían dietas con una alta proporción de concentrados, mientras que en los que recibían dietas con elevado contenido en forraje se mantuvieron los Entodiniinae, Isotrichidae y Diplodiniinae. En general, se observaron más protozoos en los fermentadores que recibían dietas con heno de alfalfa que en aquellos que recibían dietas con heno de gramíneas.
3. En fermentadores Rusitec mantenidos a pH similar, aumentar el ritmo de dilución de 3,78 a 5,42%/ h y disminuir el tiempo de retención del concentrado de 48 a 24 h influyó en la fermentación de la dieta, reduciendo la proporción molar de caproico y la relación acético:propiónico hacia valores más próximos al rango encontrado *in vivo*. Los resultados indican que utilizar ritmos de dilución más elevados y tiempos de retención del concentrado más cortos que los habitualmente utilizados en fermentadores Rusitec puede mejorar la simulación de la fermentación *in vivo* de dietas con elevado contenido en concentrados.
4. En un estudio que comparó la eficacia de tres procedimientos para desligar bacterias asociadas a la digesta ruminal de ovejas que recibieron cuatro dietas diferentes, el tratamiento de la digesta con un stomacher fue el método más eficiente, dando lugar a la recuperación del 58,3% del total de bacterias adheridas a la digesta. Sin embargo, el tratamiento de la digesta con una solución de metilcelulosa produjo los pellets más similares a las comunidades bacterianas ligadas a la digesta (84,0 y 86,4% para el forraje y el concentrado, respectivamente), y por lo tanto este método de desligamiento puede ser considerado el más apropiado en fermentadores Rusitec.
5. En un estudio que comparó los efectos de cuatro dietas sobre la fermentación ruminal y el crecimiento microbiano en fermentadores Rusitec con los observados en ovejas, los fermentadores detectaron diferencias similares a las encontradas *in vivo* entre

dietas con forrajes de diferente calidad, pero no reprodujeron las diferencias observadas entre dietas con diferente relación forraje:concentrado. Además, las comunidades protozoarias y la diversidad bacteriana en los fermentadores Rusitec no fueron totalmente representativas de las existentes en el rumen de las ovejas que recibían las mismas dietas.

6. La producción de metano los cultivos discontinuos de microorganismos ruminales se vio afectada por la relación forraje:concentrado y el tipo de forraje en la dieta de las ovejas donantes del inóculo. La producción de metano tras 24 h de incubación fue un 17,5% mayor con fluido ruminal proveniente de ovejas que recibían dietas con una elevada proporción de concentrados que con el fluido ruminal procedente de ovejas que recibían dietas con una elevada proporción de concentrados, y un 16,6% mayor al utilizar fluido ruminal de ovejas que recibían dietas con heno de alfalfa en comparación con el fluido de las ovejas que recibían dietas con heno de gramíneas.

1. In an experiment designed to analyze the evolution of fermentation parameters in Rusitec fermenters over 14 days of incubation, it was observed that under the conditions of the study, 6 days were enough to reach steady values for most of fermentation parameters. In general, fermenters operated at the high dilution rates became stabilized before than those operated at low dilution rates.
2. After 14 days of incubation of four different diets in Rusitec fermenters, it was not possible to maintain protozoa numbers similar to those in the rumen, but protozoa were present in all fermenters. Only Entodiniinae were able to grow by the end of the trial in fermenters fed high-concentrate diets, but Entodiniinae, Isotrichidae and Diplodiniinae were maintained in fermenters receiving high-forage diets. In general, greater protozoa numbers were observed in the fermenters fed diets containing alfalfa hay compared with those receiving grass hay diets.
3. In Rusitec fermenters maintained at a similar pH, increasing dilution rate from 3.78 to 5.42%/h and decreasing concentrate retention time from 48 to 24 h influenced diet fermentation, reducing molar proportions of caproate and acetate:propionate ratio to values in the range of those found *in vivo*. The results indicate that using higher dilution rates and shorter concentrate retention times than those typically used in Rusitec fermenters would improve the simulation of *in vivo* fermentation of high-concentrate diets.
4. In a study comparing the efficacy of three procedures to detach bacteria from solid ruminal digesta from sheep fed four different diets, the treatment of digesta with a stomacher was the most efficient method providing the recovery of 58.3% of the total bacteria attached to digesta. However, the treatment of digesta with a solution of methylcellulose produced pellets with the greatest similarity to the bacterial communities attached to the digesta (84.0 and 86.4% for forage and concentrate, respectively), and therefore this could be considered the most appropriate detachment procedure in Rusitec fermenters.
5. In a study comparing the effects of four diets on ruminal fermentation and microbial growth in Rusitec fermenters with those detected in sheep, fermenters detected similar differences to those found *in vivo* between diets differing in forage quality for most measured parameters, but did not mimic the differences observed between diets with different forage to concentrate ratio. Moreover, protozoa population and bacterial diversity in Rusitec fermenters were not fully representative of those in the rumen of sheep fed the same diets.

6. Methane production in batch cultures of ruminal microorganisms was affected by the forage:concentrate ratio and the type of forage in the diet of donor sheep. The production of methane after 24 h of incubation was increased by 17.5% by using ruminal fluid from sheep fed high-concentrate diets compared with inoculum from sheep fed high-forage diets, and by 16.6% by using ruminal fluid from sheep fed diets containing alfalfa hay compared with inoculum from sheep fed diets with grass hay.



*Capítulo 7*

*Resumen*

**Summary**



Se llevaron a cabo varios experimentos con fermentadores Rusitec y uno con cultivos discontinuos de microorganismos ruminales (BCRM) con el fin de analizar los efectos de diferentes factores en la fermentación ruminal *in vitro*.

Inicialmente se efectuó una prueba de 14 días de duración (prueba 1) utilizando 16 fermentadores Rusitec para investigar la evolución de los parámetros fermentativos a lo largo del período de incubación cuando los fermentadores se manejaban con diferentes ritmos de dilución (DL) y tiempos de retención (RT) del concentrado. Los fermentadores recibieron una dieta consistente en heno de alfalfa y concentrado en proporciones 30:70, y los DL fueron 3,78 (LDL) y 5,42%/h (HDL). El RT del concentrado fue de 24 (T24) o 48 h (T48), y el RT del forraje fue de 48 h en todos los fermentadores. Se observaron interacciones significativas del día de incubación con el DL y con el RT ( $P < 0,05$ ) en todos los parámetros medidos, con la excepción de las proporciones molares de acético. En general, los fermentadores sometidos a un mayor ritmo de dilución se estabilizaron antes que los manejados con el menor ritmo de dilución, y se consideró que, bajo las condiciones de este estudio, fueron suficientes 6 días para alcanzar valores estables en la mayoría de los parámetros medidos.

El objetivo de la prueba 2 fue investigar la evolución de las comunidades de protozoos a lo largo de 14 días en 16 fermentadores Rusitec que recibían 4 dietas diferentes. Las dietas tenían relaciones forraje:concentrado (F:C) de 70:30 (HF) o 30:70 (HC), con heno de alfalfa (A) o de gramíneas (G) como forraje. Se utilizó fluido ruminal procedente de ovejas que recibían las mismas dietas para inocular los fermentadores el día 0. El RT del forraje y el concentrado fue de 48 y 24 h, respectivamente, y el DL fue de 5,14%/h. El número total de protozoos disminuyó muy rápido a partir del primer día tras la inoculación, pero se mantuvieron protozoos hasta el último día en todos los fermentadores, en concentraciones que oscilaron entre  $3,30$  a  $8,52 \times 10^3$ /mL. Sólo los Entodiniinae fueron capaces de permanecer en los fermentadores que recibieron las dietas HC al final de la prueba, pero los Entodiniinae, Isotrichidae y Diplodiniinae fueron capaces de permanecer en los fermentadores que recibían las dietas HF hasta el último día. Los Ophryoscolecinae desaparecieron totalmente de todos los fermentadores el sexto día de la incubación. En general, se observaron más protozoos en los fermentadores alimentados con las dietas que contenían heno de gramíneas en comparación con los que recibían dietas con heno de alfalfa. Los resultados indicaron que no fue posible mantener comunidades protozoarias

similares a las presentes en el inóculo y que la dieta administrada a los fermentadores afectó a la supervivencia de los grupos.

El objetivo de la prueba 3 fue investigar los efectos de dos DL y dos RT del concentrado en el crecimiento microbiano, la producción de metano y la fermentación de una dieta consistente en heno de alfalfa:concentrado en proporción de 30:70 administrada a fermentadores Rusitec mantenidos a un pH similar. Los DL fueron de 3,78 (baja; LDL) o 5,42%/h (alta; HDL), y el RT del concentrado fue de 24 (T24) o 48 h (T48). El RT del forraje fue de 48 h en todos los fermentadores. La desaparición aparente de la dieta fue mayor en los fermentadores HDL comparados con los LDL, aunque el efecto del LDL fue más pronunciado en los T48 comparados con los T24. El DL no afectó a la producción de metano, pero esta producción fue mayor en los fermentadores T48 comparados con los T24. El incremento en el DL aumentó la producción de ácidos grasos volátiles (VFA) y las proporciones molares de propiónico, isovalérico y valérico, y redujo las de caproico. El aumento en el RT del concentrado resultó en una mayor producción de VFA y mayores proporciones de acético, butírico y caproico, pero redujo las proporciones de propiónico, valérico e isovalérico. La producción de N amoniacal no se vio afectada por el RT del concentrado, pero fue mayor en los fermentadores HDL comparados con los LDL. El DL no afectó al crecimiento microbiano, pero la eficiencia de síntesis fue menor en los fermentadores HDL comparados con los LDL. El crecimiento microbiano, así como su eficiencia, fueron mayores en los fermentadores T48 comparados con los T24. Los resultados parecen indicar que utilizar DL más altos y RT del concentrado más cortos que los habitualmente utilizados en fermentadores Rusitec podría contribuir a mejorar la simulación de la fermentación *in vivo* de dietas con una alta proporción de concentrados.

En la prueba 4 se evaluó la eficacia de tres procedimientos de desligamiento (DP) para desligar las bacterias asociadas a la fase sólida (SAB) de la digesta en fermentadores Rusitec que recibían una dieta consistente en heno de alfalfa y concentrado en proporciones de 30:70. El forraje y el concentrado se incubaron en bolsas de nailon separadas y los residuos de incubación se trataron independientemente. La biomasa bacteriana se marcó con  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ . Los tratamientos fueron: 1) MET: se incubaron los residuos a 38°C durante 15 minutos con solución salina (0,9% NaCl) que contenía un 0,1% de metilcelulosa, en agitación continua; 2) STO: los residuos se

mezclaron con solución salina fría y se homogeneizaron en un stomacher durante 5 minutos a 230 revoluciones por minuto; y 3) FRE: los residuos se congelaron inmediatamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 72 h, se descongelaron a  $4^{\circ}\text{C}$ , se mezclaron con solución salina y se sometieron al tratamiento STO. Un procedimiento común a los tres DP fue almacenar los residuos a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 h tras el tratamiento, seguido de un homogeneizado, filtrado y resuspensión de los residuos dos veces en la solución correspondiente al tratamiento. Los pellets bacterianos se obtuvieron por centrifugación, y el desligamiento se estimó indirectamente midiendo la eliminación del  $^{15}\text{N}$ . Para analizar la similitud entre las comunidades bacterianas ligadas al sustrato y las presentes en los pellets tras el DP correspondiente se utilizó el análisis de polimorfismos de conformación de cadena simple (SSCP). La eficiencia del desligamiento y la recuperación total de las SAB desligadas se vieron significativamente afectadas por el DP, siendo STO el tratamiento que mostró los mayores valores (64,1% de eficiencia del desligamiento y 58,3% de recuperación total) y MET los menores (57,0 y 51,8%). El DP también afectó al índice de similitud entre las SAB ligadas a los sustratos y las de los pellets, con mayores valores para el tratamiento MET (84,0 y 86,4% para forraje y concentrado, respectivamente) que para FRE (72,5 y 67,8%) y para STO, que mostró valores intermedios (77,1 y 82,4%). Aunque el tratamiento STO fue el más efectivo para desligar las SAB de ambos sustratos, el tratamiento MET produjo los pellets con la mayor similitud a las comunidades bacterianas ligadas a la digesta, y por lo tanto puede ser considerado como el DP más apropiado para tratar la digesta en fermentadores Rusitec.

En la prueba 5 se utilizaron 4 ovejas canuladas en el rumen y el duodeno y 8 fermentadores Rusitec, con el fin de determinar los efectos de la relación F:C y del tipo de forraje de la dieta sobre la fermentación ruminal, las comunidades microbianas y la diversidad bacteriana. El propósito del estudio fue determinar con qué exactitud pueden reproducir los fermentadores las diferencias entre dietas encontradas *in vivo*. Las cuatro dietas experimentales fueron las mismas que las utilizadas en la prueba 2. Los fermentadores Rusitec detectaron diferencias entre dietas similares a las observadas en las ovejas al cambiar la relación F:C en el pH, la digestibilidad de la fibra neutro detergente, las concentraciones totales de VFA, las proporciones molares de acético,

propiónico, butírico, isovalérico y caproico y la actividad amilasa. Por el contrario, los fermentadores Rusitec no reprodujeron las diferencias encontradas en las ovejas para las concentraciones de N amoniacal y de láctico, la digestibilidad de la materia seca, las proporciones de isobutírico y valérico, las actividades carboximetilcelulasa y xilanasas, y el crecimiento microbiano y su eficiencia. En lo referente al tipo de forraje de la dieta, los fermentadores detectaron diferencias similares a las observadas en las ovejas para la mayor parte de los parámetros, con la excepción del pH, la digestibilidad de la materia seca, la proporción de butírico y la actividad carboximetilcelulasa. Los valores mínimos de pH y máximos de concentración de VFA se alcanzaron a las 2 y a las 6-8 h tras la administración del alimento en las ovejas y en los fermentadores, respectivamente, indicando que la fermentación del alimento fue más lenta *in vitro* que *in vivo*. Hubo diferencias entre sistemas en la magnitud de la mayor parte de los parámetros determinados. En general, los fermentadores mostraron menores concentraciones de láctico, digestibilidad de la fibra neutro-detergente, relación acético:propiónico y actividades enzimáticas, y mayores valores de concentración de NH<sub>3</sub>-N, digestibilidad de la materia seca y proporciones de propiónico, butírico, isovalérico, valérico y caproico.

El número total de bacterias fue mayor en el rumen de las ovejas alimentadas con dietas HF comparadas con las que recibían dietas HC, mientras que en los fermentadores ocurrió lo contrario. La relación F:C no afectó al número de bacterias celulolíticas en ninguno de los dos sistemas, pero este valor fue 2,7 y 1,8 veces mayor en las ovejas que en los fermentadores para las dietas HF y HC, respectivamente. El tipo de forraje no afectó a los números de bacterias totales ni celulolíticas en ningún sistema. El descenso en la relación F:C hizo aumentar el número de protozoos un 30% en las ovejas, pero no tuvo efecto en los fermentadores. Los números de Isotrichidae y Ophryoscolecinae en las ovejas no se vieron afectados por los cambios en la relación F:C, pero ambos grupos desaparecieron de los fermentadores que recibían las dietas HC. Las concentraciones de protozoos totales y de Entodiniinae fueron mayores en las ovejas alimentadas con dietas que contenían heno de alfalfa en comparación con aquellas que consumían dietas con heno de gramíneas, mientras que en los fermentadores ocurrió lo contrario. Los resultados indican que, bajo las condiciones del estudio, las comunidades protozoarias en los fermentadores Rusitec no fueron representativas de las del rumen de las ovejas que recibían las mismas dietas. Además, el número de protozoos fue 121 y 226 veces menos que en el rumen en los fermentadores HF y HC, respectivamente. Para

analizar la diversidad de las bacterias asociadas a la fase líquida (LAB) y las SAB en ambos sistemas se utilizó el análisis automatizado del espacio intergénico ribosomal (ARISA) del rDNA 16S. El número de picos de los pellets bacterianos aislados del rumen de las ovejas detectados en los electroferogramas del ARISA oscilaron entre 24 y 52 para las LAB y entre 23 y 77 para las SAB, mientras que en los fermentadores Rusitec oscilaron entre 23 y 84 para las LAB y entre 23 y 77 para las SAB. No hubo diferencias entre las LAB y las SAB aisladas del rumen de las ovejas ni en el número de picos ni en el índice de Shannon, pero en los fermentadores las LAB mostraron mayor número de picos e índice de Shannon, indicando una mayor diversidad en comparación con las SAB. En el análisis de los dendogramas de las muestras *in vivo* se observó que los pellet SAB aislados de las ovejas alimentadas con heno de alfalfa se agruparon juntos, mientras que la mayor parte de las SAB aisladas de las ovejas que consumían heno de gramíneas se agruparon aparte, aunque aparentemente no hubo un efecto de la relación F:C. En los pellet LAB *in vivo* no pudo establecerse un patrón de agrupamiento claro basado en el tipo de forraje ni en la relación F:C. En los fermentadores Rusitec, los pellet SAB formaron dos grupos principales de acuerdo al forraje, con dos subgrupos según la relación F:C. Por el contrario, los pellet LAB se agruparon en primer lugar de acuerdo a la relación F:C, y dentro de cada grupo de acuerdo al tipo de forraje. Los resultados sugieren que en ambos sistemas las comunidades de SAB estuvieron afectadas por el tipo de forraje, principalmente. Cuando se analizaron los pellet en conjunto, el análisis de componentes principales discriminó claramente entre las muestras de ovejas y fermentadores, observándose dos grupos distintos para las muestras *in vivo* e *in vitro*. Las diferencias observadas en la fermentación y las comunidades microbianas en las ovejas y los fermentadores pueden ser atribuidas principalmente a la ausencia de absorción en los fermentadores, a diferencias en el tiempo de retención del sólido y a la mayor compartimentalización del sistema Rusitec. En general, los fermentadores Rusitec simulaban mejor la fermentación *in vivo* de las dietas con elevado contenido en forraje que la de las dietas que tenían un alto contenido en concentrado.

En la última prueba, se administraron las 4 dietas utilizadas anteriormente a 6 ovejas fistuladas en el rumen en un diseño en cuadrado latino 4 x 4 parcialmente replicado para estudiar los efectos de la relación F:C y del tipo de forraje de la dieta en la producción de metano y en la fermentación microbiana de las mismas 4 dietas *in vitro*. En cada periodo se utilizó fluido ruminal de cada una de las ovejas para inocular

BCRM que contenían 400 mg de la dieta correspondiente. Los BCRM se incubaron a 39°C durante 24 h, y posteriormente se determinaron los principales parámetros de fermentación. No hubo interacciones F:C x el tipo de forraje en ninguna de las variables medidas. La relación F:C no afectó a la producción de metano tras 8 h, pero a las 24 h de incubación la cantidad de metano fue 1,2 veces mayor con el inóculo HC que con el HF. La producción total de VFA fue un 10,4 y un 10,0% mayor para el inóculo HC comparado con el HF cuando se incubaron los sustratos HF y HC, respectivamente. El cambio de la proporción F:C en la dieta no afectó a la producción de propiónico para ningún sustrato, pero la producción de butírico aumentó al hacerlo la proporción F:C en la dieta. La relación metano:VFA y la digestibilidad aparente de la materia seca no se vieron afectadas por la relación F:C en la dieta. Para todos los sustratos, las dietas con heno de alfalfa promovieron una mayor producción de gas y de metano tras 8 y 24 h, mayor producción de VFA totales e individuales, así como mayores relaciones acético:propiónico, concentraciones de N amoniacal y digestibilidad aparente de la materia seca en comparación con las dietas que contenían heno de gramíneas. El tipo de forraje en la dieta de los animales donantes no afectó a la relación metano:VFA cuando se incubaron los sustratos HF. Hubo claras variaciones entre ovejas en la producción de metano, las cuales se mantuvieron independientemente de la dieta y el sustrato considerado. Los resultados indicaron que la producción de metano *in vitro* se ve afectada por la relación F:C y por el tipo de la dieta de los animales donantes de fluido ruminal, y por tanto estas variables deberían tenerse en cuenta cuando se realicen experimentos *in vitro*.



Several experiments were carried out with Rusitec fermenters and one with batch cultures of ruminal microorganisms (BCRM) to analyze the effects of different factors on *in vitro* ruminal fermentation. Initially, one 14-day incubation trial was carried out using 16 Rusitec fermenters to investigate the evolution of fermentation parameters with incubation day when fermenters were operated at different dilution rate (DL) and concentrate retention time. The fermenters were fed a 30:70 alfalfa hay:concentrate diet, and the DL were 3.78 (LDL) and 5.42%/h (HDL). The concentrate retention time was either 24 (T24) or 48 h (T48), and forage RT was 48 h in all fermenters. Significant incubation day x DL and incubation day x RT interactions ( $P < 0.05$ ) were observed for all the measured parameters with the exception of molar proportions of acetate. In general, fermenters operated at the HDL became stabilized before than LDL fermenters. It was concluded that under the conditions of this study, 6 days were enough to reach steady values for most of the measured parameters.

The objective of the second experiment was to investigate the evolution of protozoa numbers over 14 days in 16 Rusitec fermenters fed four different diets. The diets had forage:concentrate (F:C) ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) with either alfalfa hay (A) or grass hay (G) as forage. Ruminal inoculum from sheep fed the same diets was used to inoculate the fermenters on day 0. Retention time for forage and concentrate was 48 and 24 h, respectively, and dilution rate was preset at 5.14%/h. Total protozoa numbers declined rapidly from the first day after inoculation, but they were present by day 14 in all fermenters at concentrations which ranged from  $3.30$  to  $8.52 \times 10^3$  / mL. Only Entodiniinae were able to grow in HC-fed fermenters by the end of the trial, but Entodiniinae, Isotrichidae and Diplodiniinae were maintained in fermenters receiving HF diets. Ophryoscolecinae disappeared completely from all fermenters by day 6 of incubation. In general, greater protozoa numbers were observed in the fermenters fed diets containing G compared with those fed A diets. The results indicate that it was not possible to maintain protozoal communities in numbers similar to those in the inoculum and that the diet given to fermenters affected the survival of the different groups.

The objective of the third experiment was to investigate the effects of 2 dilution rates (DL) and 2 concentrate retention times (RT) on microbial growth, methane production, and fermentation of a 30:70 alfalfa hay:concentrate diet in Rusitec fermenters maintained at similar pH. The DL were 3.78 (low; LDL) and 5.42%/h (high; HDL), and concentrate RT was either 24 (T24) or 48 h (T48). Forage RT was 48 h in all fermenters. Diet apparent disappearance was greater in HDL fermenters compared with

LDL fermenters, although the effect of DL was more pronounced in T48 compared with T24 fermenters. Methane production was not affected by DL, but was greater in T48 compared with T24 fermenters. Increasing DL augmented volatile fatty acid (VFA) production and molar proportions of propionate, isovalerate, and valerate, and reduced those of caproate. Increasing concentrate RT resulted in greater VFA production and proportions of acetate, butyrate, and caproate, but reduced those of propionate, valerate, and isovalerate. Ammonia-N production was not affected by concentrate RT, but was greater at HDL compared with LDL. Microbial growth was not affected by DL, but microbial growth efficiency was lower in HDL compared with LDL fermenters. Microbial growth and its efficiency were greater in T48 compared with T24 fermenters. The results would indicate that using higher DL and shorter concentrate RT than those typically used in Rusitec fermenters would contribute to improve the simulation of *in vivo* fermentation of HC diets.

In the fourth experiment, three detachment procedures (DP) were evaluated for their ability to remove solid-associated bacteria (SAB) from digesta in Rusitec fermenters fed a 30:70 alfalfa hay:concentrate diet. Forage and concentrate were incubated in separate nylon bags, and incubation residues were treated independently. Bacterial biomass was labelled with  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ . Treatments were 1) MET: residues were incubated at 38°C for 15 min with saline solution (0.9% NaCl) containing 0.1% methylcellulose with continuous shaking; 2) STO: residues were mixed with cold saline solution and homogenized with a stomacher for 5 min at 230 revolutions per min; and 3) FRE: residues were immediately frozen at -20°C for 72 h, thawed at 4°C, mixed with saline solution, and subjected to STO procedure. Common to all treatments was storing at 4°C for 24 h after the treatment, homogenization, filtration, and resuspension of residues 2 times in the treatment solutions. Bacterial pellets were obtained by centrifugation, and bacterial removal was estimated indirectly by measuring removal of  $^{15}\text{N}$ . The PCR-single-stranded conformation polymorphism analysis of the 16S ribosomal DNA was used to analyze the similarity between bacterial communities attached to the substrate and those in the pellet obtained after each DP. Detaching efficiency and total recovery were significantly affected by DP, with STO showing the greatest values (64.1% for detaching efficiency and 58.3% for total recovery) and MET the least values (57.0 and

51.8%). Similarity index between the SAB attached to substrates and those in the pellets were affected by DP, with MET showing greater values (84.0 and 86.4% for forage and concentrate, respectively) than FRE (72.5 and 67.8%), and STO having intermediate values (77.1 and 82.4%). Although STO was the most effective method to detach SAB from concentrate and forage, MET produced pellets with the greatest similarity to the bacterial communities attached to the substrates and therefore may be considered the most appropriate DP method for treating digesta from Rusitec fermenters.

Four ruminally and duodenally cannulated sheep and 8 Rusitec fermenters were used in the fifth experiment to determine the effects of F:C ratio and type of forage in the diet on ruminal fermentation, microbial populations and bacterial diversity. The purpose of the study was to assess how closely fermenters can mimic the dietary differences found *in vivo*. The 4 experimental diets were those used in the second study. Rusitec fermenters detected differences between diets similar to those observed in sheep by changing F:C ratio on pH, neutral-detergent fiber digestibility, total VFA concentrations, molar proportions of acetate, propionate, butyrate, isovalerate and caproate and amylase activity. In contrast, Rusitec fermenters did not reproduce the dietary differences found in sheep for NH<sub>3</sub>-N and lactate concentrations, dry matter digestibility, proportions of isobutyrate and valerate, carboxymethylcellulase and xylanase activities, and microbial growth and its efficiency. Regarding the effect of the type of forage in the diet, Rusitec fermenters detected differences among diets similar to those found in sheep for most determined parameters, with the exception of pH, dry matter digestibility, butyrate proportion and carboxymethylcellulase activity. Minimum pH and maximal VFA concentrations were reached at 2 h and at 6-8 h post-feeding in sheep and fermenters, respectively, indicating that feed fermentation was slower in fermenters compared with sheep. There were differences between systems in the magnitude of most of determined parameters. In general, fermenters showed lower lactate concentrations, NDF digestibility, acetate:propionate ratios and enzymatic activities, and greater values of NH<sub>3</sub>-N concentrations, dry matter digestibility and proportions of propionate, butyrate, isovalerate, valerate and caproate.

Total bacterial numbers were greater in the rumen of HF-fed sheep compared with those fed HC diets, whereas the opposite was found in fermenters. The numbers of cellulolytic bacteria were not affected by F:C ratio in any fermentation system, but cellulolytic numbers were 2.7 and 1.8 times greater in sheep than in fermenters for HF

and HC diets, respectively. Neither total bacterial nor cellulolytic numbers were affected by the type of forage in sheep or fermenters. Decreasing F:C ratio increased protozoa numbers in sheep by about 30%, but it had no effect in fermenters. Isotrichidae and Ophryoscolecinae numbers in sheep were not affected by changing F:C ratio, but both disappeared completely from fermenters fed HC diets. Total protozoa and Entodiniinae numbers were greater in sheep fed diets containing alfalfa hay than in those fed diets with grass hay, whereas the opposite was found in fermenters. The results indicate that under the conditions of the present study, the protozoa population in Rusitec fermenters was not representative of that in the rumen of sheep fed the same diets. In addition, protozoa numbers in fermenters were 121 and 226 times lower than those in the sheep rumen for HF and HC diets, respectively. The automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) of the 16S ribosomal DNA was used to analyze the diversity of liquid-associated (LAB) and SAB bacteria in both systems. There was no difference between LAB and SAB isolated from sheep rumen either in the number of peaks or in the Shannon index, but in fermenters LAB had greater number of peaks and Shannon index, indicating greater diversity compared with SAB. The SAB pellets isolated from sheep fed alfalfa hay clustered together and a distinct cluster was observed for the majority of SAB from sheep fed grass hay, although F:C ratio had apparently no effect. For LAB pellets isolated from sheep, no clear clustering pattern could be established based on forage type or F:C ratio. In Rusitec fermenters, SAB pellets formed two major clusters according to basal forage, with two subclusters each according to F:C ratio. On the contrary, LAB pellets clustered first according to F:C ratio, and within each cluster according to basal forage type. The results suggest that in both systems SAB communities are mainly affected by the type of forage. When all pellets were analyzed together, the principal component analysis clearly discriminated between sheep and Rusitec pellets, and the same was observed for clustering analysis, with two distinct clusters for *in vivo* and *in vitro* samples. Observed differences between fermentation and microbial populations in sheep and fermenters can be mainly attributed to the lack of absorption in fermenters, differences in solid retention time, and compartmentalization in Rusitec system. In general, Rusitec system simulated better the *in vivo* fermentation of high-forage diets compared with high-concentrate diets.

In the last experiment, 6 rumen-fistulated sheep were fed the 4 diets used previously in a partially replicated 4 x 4 Latin square design to study the effects of F:C ratio and type of forage in the diet on *in vitro* methane production and microbial fermentation of

the same 4 diets. In each period, ruminal fluid from each sheep was used to inoculate BCRM containing 400 mg of each diet. The BCRM were incubated at 39°C for 24 h and the main ruminal fermentation parameters were determined. There were no F:C x forage interactions for any measured variable. Methane production after 8 h was not affected by F:C ratio in the diet, but after 24 h of incubation the amount of methane was 1.2 times greater with HC than with HF inoculum. Total VFA production was 10.4 and 10.0% greater for HC compared with HF inoculum when HF and HC substrates were incubated, respectively. Changing the F:C ratio in the diet did not affect propionate production for any substrate, but production of butyrate was augmented as F:C ratio in the diet increased. Methane:VFA ratios and apparent dry matter digestibility were not affected by F:C ratio in the diet. For all substrates, diets including alfalfa hay promoted greater gas and methane production after 8 and 24 h, greater production of total and individual VFA, as well as greater acetate:propionate ratios, ammonia-N concentrations and apparent dry matter digestibility compared with diets including grass hay. The type of forage in the diet of donor animals did not affect methane:VFA ratio when HF substrates were incubated. There were clear variations between sheep in methane production, which persisted across diets and substrates. The results indicate that methane production *in vitro* is affected by both F:C ratio and type of forage in the diet of donors. These variables should be taken into account when conducting *in vitro* experiments.



*Capítulo 8*  
*Bibliografía*





- Aafjes, J. H., Nijhof, J. K. 1967. A simple artificial rumen giving good production of volatile fatty acids. *Br. Vet. J.* 123: 436-445.
- Abe, M., 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.* 36: 941-950.
- Abe, M., Iriki, T. 1978. Effects of diet on the protozoa population in permeable continuous cultures of rumen contents. *Br J Nutr.* :39:255–264.
- AbuGhazaleh, A. A., Riley, M. B., Thies, E. E., Jenkins, T. C. 2005. Dilution rate and pH effects on the conversion of oleic acid to *trans* C18:1 positional isomers in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 88:4334–4341
- Adler, J. H., Dye, J. A., Boggs, D. E., Williams, H. I-I. 1958. Growth of rumen microorganisms in an *in vitro* continuous-flow system on a protein freediet. *Cornell Vet.* 48:53-66.
- Aharoni, Y., Tagari, H. 1991. Use of nitrogen-15 determinations of purine nitrogen fraction of digesta to define nitrogen traits in the rumen. *J. Dairy Sci.* 74:2540-2547.
- Alves de Oliveira L., Jean-Blain C., Komisarczuk-Bony S., Durix A., Durier C. 1997. Microbial thiamin metabolism in the rumen simulating fermenter (Rusitec): the effect of acidogenic conditions, a high sulphur level and added thiamine. *Brit. J. Nutr.* 78: 599–613.
- Akin, D. E., Benner, R. 1988. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. *App.l Environ. Microbiol.* 54:1117–1125.
- Ammar, H., Lopez, S., González, J. S., Ranilla, M. J. 2004. Chemical composition and *in vitro* digestibility of some spanish browse plant species. *J. Sci. Food. Agric.* 84:197-204.
- ANKOM. 1998. Procedures for fibre and *in vitro* analysis. Accessed at [www.ankom.com](http://www.ankom.com)
- AOAC. 1999. Official Methods of Analysis, 16th ed., 5th rev. Assoc. Off. Anal. Chem., Gaithersburg, MD.
- Archimède, H., Sauvant, D., Hervieu, J., Ternois, F., Poncet, C., 1997. Quantitative review of ruminal and total tract digestion of mixed diet organic matter and carbohydrates. *Reprod. Nutr. Dev.*37:173-189.

- Asplund, J. M. 1994. The influence of energy on amino acid supply and utilization in the ruminant. In: *Principles of Protein Nutrition of Ruminants*. Asplund, J. M. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Attwood, G. T., Klieve, A. V., Ouwerkerk, D., Patel, B. K. C. 1998. Ammonia-hyperproducing bacteria from New Zealand ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1796–1804.
- Bach, A., Yoon, I. K., Stern, M. D., Jung, H. G., Chester-Jones, H. 1999. Effects of type of carbohydrate supplementation to lush pasture on microbial fermentation in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 82: 153-160.
- Bailey, R. W. 1973. Structural carbohydrates, In *Chemistry and biochemistry of herbage*. Butler, G. W., Bailey, R. W. (Eds.). Academic Press Inc. New York.
- Bailey, R. B., Hironaka, R. 1970. Maximum loss of feed from nylon bags in the tureens of steers as related to apparent digestibility. *Can. J. Anim. Sci.* 50:325-332.
- Baker, F., Harris, S. T. 1947. Microbial digestion in the rumen (and cecum), with special reference to the decomposition of structural cellulose. *Nutr. Abstr. and Revs.* 17:3.
- Balcells, J., Guada, J. A., Castrillo, C., Gasa, J. 1991. Urinary excretion of allantoin and allantoin precursors by sheep after different rates of purine infusion into the duodenum. *J. Agric. Sci. Cambridge*, 116: 309-317.
- Barbi, J. H. T., Owen, E., Theodorou, M.K. 1993. Use of the rumen simulation technique (Rusitec) to provide microorganisms for assessing the rate of fermentation, *in vitro*, of forages. *Anim. Prod.* 56: 462.
- Bauchop, T., Clarke, R. T. 1976. Attachment of the ciliate *Epidinium Crawley* to plant fragments in the sheep rumen. *Appl Environ Microbiol.* 32: 417-422.
- Bauchop, T., Mountford, O. D. 1981. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and presence of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:1103-1110.
- Beckers, Y., Théwis, A., Maudoux, B., Francois, E. 1995. Studies on the *in situ* nitrogen degradability corrected for bacterial contamination of concentrate feeds in steers. *J. Anim. Sci.* 73:220-227.

- Beever, D. E., 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.). CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Beuvink, J. M. W., Spoelstra, S. F., Hogendorp, R. J. 1992. An automated method for measuring time-course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid. *Neth. J. Agric. Sci.* 40 401–407.
- Bhat, S., Wallace, R. J., Ørskov, E. R. 1990. Adhesion of cellulolytic ruminal bacteria to barley straw. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2698-2703.
- Blake, W. L., Stern, M. D. 1988. Influence of protein source on amino acid profile of effluent flowing from continuous culture of ruminal contents. *J. Anim. Sci.* 66:2284-2298.
- Blanchart, G., Vignon, B., 1984. Adaptation d'un fermenteur de type Rusitec. *Bull. Rechn. I.N.R.A.* 9: 1-10.
- Blanchart, G, Vignon., B. 1984. Adaptation d'un fermenteur de type Rusitec. *Cah. Techn. INRA*: 1-10.
- Blanchart, G., Durand, M., Barry, J. L., Bouillier-Odot, M., 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.* 38: 285-314.
- Blaxter, K. L. 1967. *The Energy Metabolism of Ruminants*. Hutchinson, London. UK.
- 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*: 48–58.
- Blümmel, M., Orskov, 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.* 40: 109-119.
- Blümmel, M., 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* 64:71–75.

- Blümmel, M., Makkar, H. P. S., Becker, K. 1997. *In vitro* gas production: A technique revisited. *J. Anim. Physiol.* 77:24–34.
- Boguhn, J. 2004. *In vitro* - Untersuchungen zum Einfluss der Rationszusammensetzung auf die synthese und das aminosäurenmuster des mikrobiellen proteins im pansen [Dissertation]. [Halle Saale]: Martin-Luther-Universität.
- Boguhn, J., Kluth, H., Rodehutsord, M. 2006a. Effect of total mixed ration composition on fermentation and efficiency of ruminal microbial crude protein synthesis *in vitro*. *J Dairy Sci.* 89: 1580-1591.
- Boguhn, J., Kluth, H., Rodehutsord, M. 2006b. Effect of total mixed ration composition on amino acid profiles of different fractions of ruminal microbes *in vitro*. *J Dairy Sci.* 89: 1592-1603.
- Boguhn, J., Strobel, E., Witzig, M., Tebbe, C. C., Rodehutsord, M. 2008. Description of the structural diversity of rumen microbial communities *in vitro* using single-strand conformation polymorphism profiles. *Arch. Anim. Nut.* 62: 454-467.
- Bonhomme, A. 1990. Rumen ciliates: their metabolism and relationship with bacteria and their hosts. *Anim. Feed Sci. Technol.* 30: 203–266.
- Bowie, W. C. 1962. *In vitro* studies of rumen microorganisms using a continuous-flow system. *Am. J.Vet. Res.* 23:858-862.
- Brock, T. D. 1966. *Principles of Microbial Ecology*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. USA.
- Broderick, G. A., Merchen, N. R. 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *J. Dairy Sci.* 75: 2618-2632.
- Broudiscou L., Jouany J. P. 1995. Reassessing the manipulation of protein synthesis by rumen microbes. *Reprod. Nutr. Develop.* 35: 517-535.
- Brossard, L., Martin, C., Michalet-Doreau, B. 2003. Ruminal fermentative parameters and blood acido-basic balance changes during the onset and recovery of induced latent acidosis in sheep. *Anim. Res.* 52:513-530.
- Bryant, M. P., 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.* 51: 1950-1955.

- Calsamiglia, S., Stern, M D., Firkins, J. L. 1995. Effects of protein source on nitrogen metabolism in continuous culture and intestinal digestion *in vitro*. *J. Anim. Sci.*73: 1819-1827.
- Calsamiglia, S., Stern, M D., Firkins, J. L. 1996. Comparison of <sup>15</sup>N and purines as microbial markers in continuous cultures. *J. Anim. Sci.* 74: 1375-1381.
- Calsamiglia, S., Ferret, A., Devant, M. 2003. Effects of pH and pH fluctuations of microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 85: 574-579.
- Calsamiglia, S., Cardozo, P. W., Ferret, A., Bach, A. 2008. Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *J. Anim. Sci.* 86: 702-711.
- Calsamiglia, S., Ferret, A., Plaixats, A. J., Devant, M. 1999. Effect of pH and pH fluctuations on microbial fermentation in a continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 82:38. (Abstr.)
- Cantalapiedra-Híjar, G., Yáñez-Ruiz, D. R., Martín-García, A. I., Molina-Alcaide, E. 2009. Effects of forage:concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation and microbial growth in goats. *J. Anim. Sci.* 87: 622-631.
- Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C. 2004. Effects of plant extract on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 82: 3230-3236.
- Carrillo, L. 2003. Rumen y biogas. Capítulo 5 en: *Microbiología agrícola*. Universidad Nacional de Salta, Argentina. Acceso online en [www.unsa.edu.ar/matbib](http://www.unsa.edu.ar/matbib)
- Carro, M. D. 2001. La determinación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen: Comparación entre marcadores microbianos (revisión). *Invest. Agr: Prod. San. Anim.* 16 (1): 5-27.
- Carro, M. D., 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* semicontinuous culture system (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 82: 149-157.
- Carro, M. D., Miller, E. L. 2002. Comparison of microbial markers (<sup>15</sup>N and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. *Anim. Sci.* 75: 315-321.

- 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., Lebzien, P., Rohr, K. 1995. Effects of pore size of nylon bags and dilution rate parameters in a semi-continuous artificial rumen. *Small Rumin. Res.* 15: 113-119.
- Carro, M. D., Ranilla, M. J., Tejido, M. L. 2005. Using the *in vitro* gas production technique to test feed additives: effects of correcting values for different blanks. *Animal Feed Sci. Technol.* 123: 173-184.
- Carro, M. D., López, S., González, J. S., Ovejero, F. J. 1994. Comparison of laboratory methods for predicting digestibility in sheep of hay. *Small Rum. Res.* 14: 9-17.
- Carro M. D., López, S., Valdés, C., Ovejero, F. J. 1999. Effect of DL-malate on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen simulation technique (Rusitec). *Anim. Feed Sci. Technol.* 79: 279-288.
- Carro, M. D., Ranilla, M. J., Martin-Garcia, A. I., Molina-Alcaide, E. 2009. Comparison of microbial fermentation of high- and low-forage diets in Rusitec, single-flow continuous-culture fermenters and sheep rumen. *Animal.* 3: 527-534.
- 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 offered food at a fixed and restricted level of intake. *Anim. Sci.* 70: 127-134.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A. 2006. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. *J. Dairy Sci.* 89: 2649-2658.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A., Losa, L. 2005. Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119: 29-41.
- Cerrato-Sánchez, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. 2007. Low ruminal pH has negative effects on ruminal fermentation. *J Dairy Sci.* 90: 4368 – 4377.
- Cheng, K.J., Wallace, R. J. 1979. The mechanism of passage of endogenous urea through the rumen wall and the role of ureolytic epithelial bacteria in the urea flux. *British Journal of Nutrition* 42: 553–557.

- Cheng, K. J., Mccowan, R. P. Costerton, J. W. 1979. Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function. *American Journal of Clinical Nutrition* 32: 139–148.
- Cheng, P., Muller, R. E., Jaeger, S., Bajpai, R., Iannotti, E. L. 1991. Lactic acid production from enzyme-thinned corn starch using *Lactobacillus amylovorus*. *Industrial Microbiology* 7: 27–34.
- Cheng, K. J., McAllister, T. A. 1997. Compartmentation in the rumen. In: *The rumen microbial ecosystem*. Hobson, P. N., Stewart, C. S. (Eds.). Blackie Academic and professional. London, UK.
- Chenost, M., Andrieu, J., Aufrère, J., Demarquilly C. 1997. Some methodological aspects for predicting whole plant maize digestibility from the “gas-test” technique. *Options Méditerranéennes series A*. 34:137–141.
- Chester-Jones, H., Stern, M. D., Metwally, H. M., Linn, J. G., Ziegler, D. M. 1991. Effects of dietary protein-energy interrelationships on holstein steer performance and ruminal bacterial fermentation in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 69:4956–4966.
- Clark, J. H., Klusmeyer, T. H., Cameron, M. R. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75: 2304-2323.
- Colombatto, D., 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.* 85: 559-568.
- Colombatto, D., Mould, F.L., Bhat, M.K., Owen, E., 2007. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the *in vitro* ruminal fermentation of alfalfa stems. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137, 150–162.
- 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.* 73: 2143-2156.
- Cone, J. W., Van Gelder, A. H., Bachmann, H., 2000. Influence of inoculum source, dilution and storage of rumen fluid on gas production profiles. In: *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), Edinburgh, U.K: 74–75.
- Cone, J.W., Van Gelder, A. H., Bachmann, H. 2002. Influence of inoculum source on gas production profiles. *Anim. Feed Sci. Technol.* 99 :221–231.
- Cone, J. W., 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.
- Cotta, M. A., Russell, J. B. 1982. Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 65: 226-234.
- Cotta, M. A., Hespell, R. B. 1986. Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrosolvens*. *Appl Environm microbiol.* 52:52-58.
- Craig, W. M., Broderick, G. A., Ricker, D. B. 1987a. Quantiation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. *J. Nutr.* 117: 56-62.
- Craig, W. M, Hong, B. J., Broderick, G. A., Bula, R. J. 1984. *In vitro* inoculum enriched with particle associated microorganisms for determining rates of fiber digestion and protein degradation. *J. Dairy Sci.* 67:2902-2909.
- Craig, W. M., Brown, D. R., Broderick, G. A., Ricker, D. B. 1987b. Post-prandial compositional changes of fluid- and particle- associated ruminal microorganisms. *J. Anim. Sci.* 65: 1042-1048.
- Crawford, R. J., Hoover, W. H., 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.* 51: 975-985.
- Crawford, R. J., Hoover, W. H., 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.* 51: 986-995.
- Crawford, R. J., Shriver, B. J., Varga, G. A., Hoover, W. H. 1983. Buffer requirements for maintenance of pH during fermentation of individual feed in continuous cultures. *J. Dairy Sci.* 66: 1881-1890.
- Cunningham, J. G. 1994. *Fisiología Veterinaria*. Interamericana. Mc Graw-Hill.
- Czerkawski, J.W. 1986. *An introduction to rumen studies*. Pergamon Press, Oxford, UK.



- Czerkawski, J. W. 1979. Annual Report of the Hannah Research Institute. Pp 69-85. Ayr, Scotland, UK.
- Czerkawski, J. W., Breckenridge, G. 1969. Fermentation of various soluble carbohydrates by rumen microorganisms with particular reference to methane production. *Brit. J. Nutr.* 23: 925-937.
- Czerkawski, J. W., Breckenridge, G. 1972. Fermentation of various soluble carbohydrates by rumen micro-organisms with particular reference to methane production. *Br J Nutr.* 38:281-287.
- Czerkawski, J. W., Breckenridge, G. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 38: 371-384.
- Czerkawski, J. W., Breckenridge, G. 1979. 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 micro-organisms. *Proc. Nutr. Soc.* 37: 70A.
- Czerkawski, J. W., Breckenridge, G. 1979. Experiments with the long-term rumen simulation technique (Rusitec). Response to supplementation of basal rations. *Br. J. Nutr.* 42: 217-228.
- Czerkawski, J. W., Cheng, K. J. 1988. Compartmentation in the rumen. The Rumen Microbial Ecosystem. Pp 361-385. Hobson, P. N. (Ed). Elsevier Science Publishing. NY, USA.
- Danovaro, R., Luna, G. M., Dell'Anno, A., 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.* 72: 5982-5989.
- Davey, L. A., Chesseman, G. C., Briggs, C. A. E. 1960. Evaluation of an improved artificial rumen designed for continuous control during prolonged operation. *J. Agr. Sci.* 55:155-163.
- Davies, D. R., Theodorou, M. K., Lawrence, M. I. G., Trinci, A. P. J. 1993. Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1395-1400.

- Davies J. L, Baganz, F., Ison, A. P., Lye, G. J. 2000. Studies on the interaction of fermentation and microfiltration operations: erythromycin recovery from *Saccharopolyspora erythraea* fermentation broths. *Biotechnol. Bioeng.* 69: 429–439.
- Davies, Z. S., Mason, D., Brooks, A. E., Griffith, G. W., Merry, R. J., Theodorou, M. K., 2000. An automatic system for measuring gas production from forages incubated with rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 83: 205–221.
- De Boever, J., Kohen, F., Usanachitt, C., Vandekerckhove, D., Leyseele, D., Vandewalle, L. 1986. Direct chemiluminescence immunoassay for estradiol in serum. *Clin. Chem.* 32: 1895-1900.
- Dehority, B. A. 1993. *Laboratory manual for classification and morphology of ruminal ciliate protozoa*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Dehority, B. A., 1995. Methodology for measuring microbial growth in the rumen. In: *Proceedings of the International Symposium on the Nutrition Requirements of Ruminants*, Universidad Federal de Vicosa, Vicosa- MG-Brasil: 121-137.
- Dehority, B. A. 2003: *Rumen Microbiology*. Ed: Nottingham University Press.
- Dehority, B. A., Mattos, W. R. S. 1978. Diurnal changes and effect of ration on concentrations of the rumen ciliate *Charon ventriculi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 953-958.
- Dehority, B. A. 2004. *In vitro* determination of generation times for *Entodinium exiguum*, *Ophryoscolex purkynjei* and *Eudiplodinium maggii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51: 333-338.
- Dehority, B. A., Grubb, J. A. 1980. Effect of short-term chilling of rumen contents on viable bacterial numbers. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 (2): 376-381.
- Dehority, B. A., Orpin, C. G. 1997. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. In: *The rumen microbial ecosystem*. Hobson, P. N., Stewart, C. S. (Ed). Blackie Academic and Professional. London, UK.
- Dehority, B. A., Tirabasso, P. A., Grifo, A. P. Jr. 1989. Most probable-number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2789–2792.

- Demeyer, 1981. Rumen microbes and digestion of plant cell walls, *Agric. Environ.* 6: 295–337
- Demeyer, D. L. Fievez, V. 2000. Ruminants et environnement: la méthanogenèse. *Ann. Zootech.*, 49: 95-102.
- Denman, S. E., Nicholson, M. J., Brookman, J. L., Theodorou, M. K., McSweeney, C.S. 2008. Detection and monitoring of anaerobic rumen fungi using an ARISA method, *Lett. Appl. Microbiol.* 47: 492–499.
- Devant, M., Ferret, A., Calsamiglia, S., Casals, R., 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.* 79:1944–1953.
- Dewhurst, R. J., Moorby, J. M., Dhanoa, M. S., Evans, R. T., Fisher, W. J. 2000. Effects of altering energy and protein supply to dairy cows during the dry period. 1. Intake, body condition, and milk production. *J. Dairy Sci.* 83:1782-1794.
- Dhanoa, M. S. France, J. Crompton, L. A., Mauricio, R. M., Kebreab, E., Mills, J. A. N. Sanderson, R., Dijkstra, J., Lopez, S. 2004. A proposed method to determine the extent of degradation of a feed in the rumen from the degradation profile obtained with the *in vitro* gas production technique using faeces as the inoculum. *J. Anim. Sci.* 82:733–746.
- Dijkstra, J., Forbes, J. M., France, J. 2005. Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. CAB International, Wallingford, UK.
- Dong, Y., Bae, H. D., McAllister, T. A., Mathison, G. W., Cheng, K. J. 1997. Lipid-induced depression of methane production and digestibility in the artificial rumen system (RUSITEC). *Can. J. Anim. Sci.* 77: 269-278.
- Doré, J., Gouet, P. H. 1991 Microbial interactions in the rumen. In: *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. Jouany, J. P. (Ed.). INRA Editions. Paris, Cedex. France.
- Dowman, M. G., Collins, F. C. 1982. The use of enzyme to predict the digestibility of animal feeds. *J. Sci. Fd. Agric.* 33: 689–696.
- 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.* 71 :131–143.

- Durand, M., Dumay, C., Beaumatin, P., Morel, M.T. 1988. Use of the rumen simulation technique (RUSITEC) to compare microbial digestion of various by-products. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 21: 197-204
- Eadie, J. M. 1962. The development of rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management. *J. Gen. Microbiol.* 29: 563-578.
- El-Shaer, H. M., Omed, H. M. Chamberlain, A. G. 1987. Use of faecal organisms from sheep for the *in vitro* determination of digestibility. *J. Agric. Sci. Camb.* 109: 257-259.
- Erfle, J. D., Boila, R. J., Teather, R. M., Mahadevan, S., Sauer, F. D. 1982. Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 65:1457-1464.
- Esdale, W. J., Broderick, G. A., Satter, L. D. 1968. Measurement of ruminal volatile fatty acid production from alfalfa hay or corn silage rations using a continuous infusion isotope dilution technique. *J. Dairy Sci.* 51:1823.
- Eun, J. S., Fellner, V., Gumpertz, M. L. 2004. Methane production by mixed ruminal cultures incubated in dual-flow fermenters *J. Dairy Sci.* 87: 112-121.
- Ewart, J. M. 1974. Continuous *in vitro* rumen systems. *Proc. Nutr. Soc.* 33 (2): 125-133.
- Faichney, G. J. 1980. Measurement in sheep of the quantity and composition of rumen digesta and of the fractional outflow rates of digesta constituents. *Austr. J. Agric. Res.* 31: 1129-1137.
- Faichney, G. J., White, G. A. 1988. Rates of passage of solutes, microbes and particulate matter through the gastro-intestinal tract of ewes fed at a constant rate throughout gestation. *Aust. J. Agric. Res.* 39:481.
- Fellner, V., Sauer, F. D., Kramer, J. K. G.. 1995. Steady state rates of linoleic acid biohydrogenation by ruminal bacteria in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 78:1815-1823.
- 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, UK.
- Fina, L. R., Teresa, G. W., Bartley, E. E.. 1958. An artificial tureen technique for studying rumen digestion *in vivo*. *J. Anim. Sci.* 17:667-674.

- Fina, L. R., Keith, C. L., Bardey, E. E., Hartman, P. A., Jacobson, N. L. 1962. Modified *in vivo* artificial rumen (VIVAR) techniques. *J. Anim. Sci.* 21:930-934
- Firkins, J. L. 1996. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. *J. Nutr.* 126:1347–1354.
- Firkins, J. L., Weiss, W. P., Piwonka, E. J. 1992. Quantification of intraruminal recycling of microbial nitrogen using <sup>15</sup>N. *J. Anim. Sci.* 70: 3223–3233.
- Firkins, J. L., Allen, M. S., Oldick, B. S., St. Pierre, R. 1998. Modeling ruminal digestibility of carbohydrates and microbial protein flow to the duodenum. *J. Dairy Sci.* 81: 3350-3369.
- Fisher, M. M., Triplett, E. W. 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 65: 4630–4636.
- 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.* 144: 196-211.
- Forsberg, C. W., Lam, K. 1977. Use of adenosine 5'- triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen content. *Appl. Environm. Microbiol.* 33: 528-537.
- France, J., Siddons, R. C. 1993. Volatile fatty acids production. In *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. Forbes, J. M., France, J. (Eds.). CAB International, Wallingford, Oxon, U.K.
- Franzolin, R., Dehority, B. A. 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *J. Anim. Sci.* 74: 2803-2809.
- Fu, C. J., Felton, E. E. D. Lehmkuhler, J. W., Kerley, M. S. 2001. Ruminal peptide concentration required to optimize microbial growth and efficiency. *J. Anim. Sci.* 79:1305–1312.
- Fuchigami, M., Senshu, T., Horiguchi, M. 1989. A simple continuous culture system for rumen microbial digestion study and effects of defaunation and dilution rates. *J. Dairy Sci.* 72: 3070-3078.
- Gäbel G., Sehested, J. 1997. SCFA transport in the forestomach of ruminants. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 118: 367–374.

- García-López, P. M., Kung, L. Jr., Odom, J. M. 1996. *In vitro* inhibition of microbial methane production by 9,10-anthraquinone. *J. Anim. Sci.* 74: 2276-2284.
- García-Martínez, R., Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Carro, M. D. 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.
- Getachew, G., Makkar, H. P. S., Becker, K. 1998. The *in vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72: 261-281.
- Getachew, G., DePeters, E. J., Robinson, P. H., Fadel, J. G. 2005. Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 547-559.
- Giraldo, L. A., Ranilla, M. J., Tejido, M. L., 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.
- Giraldo, L. A., Tejido, M. L., Ranilla, M. J., Carro, M. D. 2007. Effect of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in Rusitec fermenters. *J. Anim. Sci.* 85: 1962-1970.
- Giraldo, L. A., Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Carro, M. D. 2008. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay based diet. *J. Anim. Sci.* 86: 1617-1623.
- Givens, D. I., Moss, A. R., 1994. Effect of breed, age and body condition of sheep in measurement of apparent digestibility of dried grass. *Anim. Feed Sci. Technol.* 46:152-162.
- Gordon, G. L. R., Phillips, M. W. 1998. The role of anaerobic gut fungi in ruminant. *Nutr. Res. Rev.* 11: 135-168.
- Gizzi, G., Zanchi, T., 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.* 73: 291-305.

- Goad, D. W., Goad, C. L., Nagaraja, T. G. 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J Anim. Sci.* 76. p. 234-241.
- Godoy, S., Meschy, F. 2001. Utilisation 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.* 41: 259-265.
- Goering, H. K., Van Soest, P. J., 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). In: *Agriculture Handbook* No. 379. Agriculture Research Service, United States Department of Agriculture. Washington DC, USA.
- Gómez, J. A., Tejido, M. L., Carro, M. D. 2005. Influence of disodium malate on microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters receiving medium- and high-concentrate diets. *Br. J. Nutr.* 93: 479-484.
- Grant, R. J., Mertens, D. R. 1992. Impact of *in vitro* fermentation techniques upon kinetics of fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 75:1263–1272.
- Gray, F. V., Wefler, R. A. Pilgrim, A. F. Jones, G. B. 1962. A stringent test for the artificial rumen. *Australian J. Agr. Res.* 13:343-350.
- Grenet, E., Breton, A., Barry, P., Fonty, G. 1989. Rumen anaerobic fungi and plant substrate colonization as affected by diet composition, *Anim. Feed Sci. Technol.* 26: 55–70.
- Griswold, K. E., Apgar, G. A., Bouton, J., 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.* 81:329–336.
- Groot, J. C. J., Cone, J. W., William, B. A., Debersaques, F. M. A. 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feedstuff. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64: 77–89.
- Hannah, S. M., Stern, M. D., Ehle F. R. 1986. Evaluation of a dual flow continuous culture system for estimating bacterial fermentation *in vivo* of mixed diets containing various soybean products. *Anim. Feed Sci. Technol.* 16: 51-62.
- Harbers, L. H., Tiflman, A. D. 1962. Continuous liquid culture of rumen microorganisms. *J. Animal Sci.* 21:575-582.

- Harfoot, C. G., Hazlewood, G. P. 1997. Lipid Metabolism in the Rumen. in *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. M. Hobson, (Ed.) Elsevier, NY.
- Harrison, D. G., McAllan, A. B. 1980. In: *Factors Affecting Microbial Growth Yields in the Reticulorumen*. Ruckebusch, Y., Thivend, P. (Eds.). MTP Press Ltd., Lancaster.
- Hervás, G., Frutos, P. Giráldez, F. J. Mora, M. J. Fernández, B., Mantecón, A. R.. 2005. Effect of preservation on fermentative activity of rumen fluid inoculum for *in vitro* gas production techniques. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124:107–118.
- Hillman, K., Williams A. G., Lloyd, D. 1991. Evaluation of matrices in the rumen simulation technique (Rusitec) for the maintenance of ciliate protozoa. *Letters Appl. Microbiol.* 12: 129-132.
- Hino, T., Sugiyama, M. Okumura, K. 1993. Maintenance of protozoa and methanogens, and fiber digestion in rumen-simulating continuous culture, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 39: 35–45.
- Hobson, P. N. 1965. Continuous culture of some anaerobes and facultative anaerobic rumen bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 38: 167-173.
- Hobson PN. 1971. Rumen microorganisms. *Prog Ind Microbiol.* 9: 41–77.
- Hobson, P. N., Wallace, R. J. 1982. Microbial ecology and activities in the rumen: part II. *CRC Critic. Rev. Microbiol.* 9: 253-319.
- Hobson, P. N., Wallace, R. J. 1982. Microbial ecology and activities in the rumen: Part II. *Crit. Rev. Microbiol.* 9: 253-320.
- Hoffmann, R. R. 1988. Anatomy of the gastrointestinal tract. In: *The ruminant animal: Digestive physiology and nutrition* Church, D. C. (Ed.). Englewood Cliffs, Prentice-Hall. NJ:
- Holden, L. A. 1999. Comparison of methods of *in vitro* dry matter digestibility for ten feeds. *J. Dairy Sci.* 82:1791–1794.
- Hoover, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69:2755–2766.



- Hoover W. H., Crooker, B. A., Sniffen, C. J. 1976a. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43: 528-534.
- Hoover, W. H., Crawford, R. J. Jr., Stern, M. D. 1982. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. III. Solids retention time. *J. Anim. Sci.* 54: 849-854.
- Hoover, W. H., Miller, T. K., Stokes, S. R. 1989. Effects of fish meals on rumen bacteria fermentation in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 72: 2991-2998.
- Hoover, W. H., Kincaid, C. R., Varga, G. A., Thayne, W. V., Junkins L. L. Jr. 1984. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. IV. pH and dilution rate. *J. Anim. Sci.* 58: 692-699.
- Hoover, W. H., Knowlton, P. H., Stern, M. D., Sniffen, C. J. 1976b. Effects of differential solid-liquid removal rates on fermentation parameters in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43: 535-542.
- Hoover, W. H., Tucker, C., Harris, J., Sniffen, C. J., de Ondarza, M. B. 2006. Effects of nonstructural carbohydrate level and starch:sugar ratio on microbial metabolism in continuous culture of rumen contents. *Anim. Feed Sci. Technol.* 128:307–319.
- Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., Igarashi, Y. 2006. Direct comparison of single-strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16rRNA gene fragments. *J. Microbiol. Methods.* 66: 165-169.
- Hovell, F. D., Deb, J. W. Ngambi, W. P., Kyle, D. J. 1986. The voluntary intake of hay by sheep in relation to its degradability in the rumen as measured in nylon bags. *Anim. Prod.* 42:111–118.
- Hristov, A. N., Ivan, M., Rode, L. M., McAllister, T. A. 2001. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets. *J. Anim. Sci.* 79: 515-524.
- Hungate, R. E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 14:1-49. 16.
- Hungate, R. E. 1966 *The rumen and its microbes*. Academic Press, London and New York.

- Hungate, R. E., Fletcher, D. W. Dougherty, R. W. Barrentine, B. F. 1955. Microbial activity in the bovine rumen: Its measurement and relation to bloat. *Applied Microbiol.* 3: 161.
- Huntington, J. A. Givens, D. I. 1995. The in situ technique for studying the rumen degradation of feeds: a review of the procedure. *Nutr. Abst. Rev.* 65:63–93.
- Huntington, J. A. Rymer, C. Givens, D.I. 1998. The effect of host diet on the gas production profile of hay and high-temperature dried grass. *Anim. Sci.* 67: 59–64.
- Ipharraguerre, I. R., Reynal, S. M., Liñeiro, M., Broderick, G. A., Clark, J. H. 2007. A comparison of sampling sites, digesta and microbial markers, and microbial references for assessing the postruminal supply of nutrients in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 1904–1919.
- Isaacson, H. R., Hinds, F. C., Bryant, M. P., Owens. F. N. 1975. Efficiency of energy utilization by mixed rumen bacteria in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 58: 1645-1659.
- Ishaque, M., Thomas, P. C., Rook, J. A. F. 1971. Consequences to the host of changes in rumen
- Iversen, E., Wilhelmsen E. Criddle, R.S. Calorimetric examination of cut fresh pineapple metabolism. *J. Food Sci.* 54: 1246–1249.
- Jalc, D.; Jayasuriya, M. C. N., Hamilton, R. 1989. The fermentation characteristics of diets containing acid-treated beech-sawdust in an artificial rumen *Biological Wastes.* 30: 289-300.
- Jalc, D., Potkanski, A., Szumacher-Strabel, M., Kowalczyk, J., Cieslak, A. 2006. The effect of a forage diet and different fat sources on rumen fermentation *in vitro*. *J. Anim. Feed Sci* 15: 129-132.
- Jayasuriya, M. C. N., Hamilton, R., Rogovic, B. 1987. The use of an artificial rumen to assess low quality fibrous feeds. *Biological Wastes:* 241-250
- Jenkins, T. C. 1987. Effects of fats and fatty acid combinations on ruminal fermentation in semi-continuous *in vitro* cultures. *J. Anim. Sci.* 64: 1526-1532.
- Johnson, R. R. 1963. Symposium on microbial digestion in ruminants: *in vitro* fermentation techniques. *J. Anim. Sci.* 22:792-800.

- Jones, R. J., Barnes, P. 1996. *In vitro* digestibility assessment of tropical shrub legumes using rumen fluid or fecal fluid as the inoculum source. *Tropical Grasslands*.30: 374-377.
- Jones, D. H. J., Hayward, M. V. 1975. The effect of pepsin pre-treatment of herbage on prediction of dry matter digestibility. *J. Sci. Food Agric.* 26: 711–718.
- Jones, D. I. H., Theodorou, M. K., 2000. Enzyme techniques for estimating digestibility. In: Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. Givens, D.I., Owen, E., Axford, R.F.E., Omed, H.M. (Eds.). CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Jouany, J. P. 1989. Effects of diet on populations of rumen protozoa in relation to fibre digestion. In: *The roles of protozoa and Fungi in ruminant digestion*. Nolan, J. V., Leng, R. A., Demeyer, D. I. (Eds.). Penambul books. Armidale, Australia.
- Jouany, J. P., 1996. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *Journal of Nutrition*. 126:1335-1346.
- Jouany, J., Thivend, P. 1986. *In vitro* effect of avoparcin on protein degradability and rumen fermentation. *Animal Feed Sci. and Technol.* 15:215-229.
- Jouany, J. P., Ushida, K. 1998. The role of protozoa in feed digestion. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 12: 113–128.
- Julier, B., Lila, M., Furstoss, V., Travers, V., Huyghe, C. 1999. Measurement of cell-wall digestibility in lucerne using the filter bag technique. *Animal Feed Sci. and Technol.* 79. 239-245.
- Kamel, C., Greathead, H. M. R., Tejido, M. L., Ranilla, M. J., 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.
- Karunanandaa, K, Varga, G. A. 1996. Colonization of rice straw by white-rot fungi (*Cyathus stercoreus*): Effect on ruminal fermentation pattern, nitrogen metabolism and fibre utilization during continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 61: 1-16
- Kennedy, P. M., Murphy, M. R. 1988. The nutritional implications of differential passage of particles through the ruminant alimentary tract. *Nutr. Res. Rev.* 1:189.
- Kennedy, P. M., Boniface, A. N., Liang, Z. J., Muller, D., Murray, R. M. 1992. Intake and digestion in swamp buffaloes and cattle. II. The comparative response to urea

- supplements in animals fed tropical grasses. *Journal of Agricultural Science* 119: 243-254.
- Khazaal, K., Dentinho, M. T., Ribeiro J. M., Ørskov, E. R. 1993. A comparison of gas production during incubation with rumen contents *in vitro* and nylon bag degradability as predictors of the apparent digestibility *in vivo* and the voluntary feed intake of hays. *Anim. Prod.* 57: 105–112.
- Koenig, K. M., Newbold, C. J., McIntosh, F. M. Rode, L. M. 2000. Effects of protozoa on bacterial nitrogen cycling in the rumen, *J. Anim. Sci.* 78:2431–2445.
- Kreikemeier, K. K., Harmon, D. L. Brandt, R. T. Jr., Nagaraja, T. G. Cochran, R. C. 1990. Steam-rolled wheat diets for finishing cattle: Effects of dietary roughage and feed intake on finishing steer performance and ruminal metabolism. *J. Anim. Sci.* 68: 2130–2141.
- Kocherginskaya, S., Aminov, R., White, B. 2001. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Random Sequencing, and Statistical ecology approaches. *Annaerobe.* 7: 119-134.
- Komarek, R. J. 1981. Rumen and abomasal cannulation of sheep with specially designed cannulas and a cannula insertion instrument. *J. Anim. Sci.* 52: 790-795.
- Komisarczuk, S., Durand, M., Beaumatin, P., Hannequart, G. 1987a. Use of <sup>15</sup>N for measuring of microbial protheosynthesis on the solid and liquid phases of a semi-continuous fermenter (Rusitec). *Reprod. Nutr. Develop.* 27: 261-262.
- Komisarczuk, S., Merry, R. J., Mc Allan, A. B. 1987b. Effects of different levels of phosphorous on rumen microbial fermentation and synthesis determined using a continuous culture technique. *Br. J. Nutr.* 57: 279-290.
- Krishnamoorthy, U., H. Soller, H. M. Steingass, K. H. Menke. 1991. A comparative study on rumen fermentation of energy supplements *in vitro*. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* (Berl.) 65:28–35.
- Leedle, J. A. Z., Greening, R. C. 1988. Postprandial changes in methanogenic and acidogenic bacteria in the rumen of steers fed high-or low-forage diets once only. *Appl. Environm. Microbiol.* 54: 502-506.

- Leedle, J. A. Z., Bryant, M. P., 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.* 44: 402-412.
- Legay-Carmier, F., Bauchart., D. 1989. Distribution of bacteria in the rumen contents of dairy cows given a diet supplemented with soya-bean oil. *Br. J. Nutr.* 61: 725-740.
- Liyama, K., Lam ,T. R. T., Stone, B. A. 1994. Covalent cross links in the cell wall, *Plant Physiol.* 104: 315–320.
- Lopez, S., F. M. McIntosh, R. J. Wallace, and C. J. Newbold. 1999. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78:1–9.
- Lourenço M., Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Fievez, V. 2008. Effects of saponins, quercetin, eugenol, and cinnamaldehyde on fatty acid biohydrogenation of forage polyunsaturated fatty acids in dual-flow continuous culture fermenters. *J. Anim. Sci.* doi:10.2527/jas.2007-0708.
- Louw, J. G., Williams, H. H., Maynard, L. A. 1949. A new method for the study *in vitro* of rumen digestions. *Science* 110:478-480.
- Lowman, R. S. Jessop, N. S. Theodorou, M. K. Herrero, M., Cuddeford, D. 1998. A comparison between two *in vitro* gas production techniques to study fermentation profiles of three foodstuffs. In: *In vitro Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants*. Deaville, E. R., Owen, E., Adesogen, A. T., Rymer, C., Huntington, J. A., Lawrence, T. L. J. (Eds.). BSAS, Edinburgh, UK Lowman, R. S., Theodorou, M. K., Cuddeford, D. 2002. The effect of sample processing on gas production profiles obtained using the pressure transducer technique *Anim. Feed Sci. Technol.* 97: 221–237.
- Macheboeuf, D., Jestin, M. 1997. Utilization of the gas test method using horse faeces as a source of inoculum, *Proceedings of the Symposium on In vitro Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants* Brit. Soc. Anim. Sci., P.O. Box 3, Penicuik, Midlothian EH26 ORZ.
- Macheboeuf, D. Jestin, M. Andrieu, M., 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.*, P.O. Box 3, Penicuik, Midlothian EH26 ORZ.

- Mackie, R. I., A. Sghir, and H. R. Gaskins. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69:1035S–1045S.
- Mackie, R. I. Gilchrist, F. M. C. Robberts, 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. *J. Agric. Sci.* 90: 241–254.
- Mahadevan, S., Sauer, F. D., Erfle, J. D. 1987. Preparation of protease from mixed rumen microorganisms and its use for the *in vitro* determination of the degradability of true protein in feedstuffs. *Can. J. Anim. Sci.* 67:55-63.
- Mambrini, M., 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.* 37: 427-442.
- Mansfield, H. R., Endres, M. I., Stern, M. D. 1994. Influence of nonfibrous carbohydrate and degradable intake protein on fermentation by ruminal microorganisms in continuous-culture. *J. Anim. Sci.* 72: 2464-2474.
- Mansfield, H. R., Endres, M. I., Stern, M. D. 1995. Comparison of microbial fermentation in the rumen of dairy cows and dual flow continuous-culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55: 47-66.
- MARM. 2008. Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino. Disponible online en: [www.marm.es](http://www.marm.es).
- Marston, H. R. 1948. The fermentation of cellulose *in vitro* by organisms from the rumen of sheep. *Biochem. J.* 42:564.
- Martin, C., Williams, A. G., Michalet-Doreau, B. 1994. Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents. *J. Anim. Sci.* 72: 2962-2968.

- Martín-García, I. 2001. Potencial de la hoja de olivo y del orujo de dos fases como alimentos para ovino y caprino. Valoración nutritiva mediante técnicas de simulación. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Martín-García, I., Yáñez-Ruiz, D. R., Moumen, A., Molina-Alcaide, E. 2006. Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal on olive (*Olea europaea* var. *Europaea*) leaf fermentation in continuous fermenters. *Small Rum. Res.* 61: 53-61.
- Martín-Orúe, S. M., Balcells, J., Zakraoui, F., Castrillo, C. 1998. Quantification and chemical composition of mixed bacteria harvested from solid fractions of rumen digesta: effect of detachment procedure. *Anim. Feed Sci. Technol.* 71: 269-282.
- Masoero, F., Moschini, M., Rossi, F., Prandini, A., Pietri, A. 1999 Nutritive value, mycotoxin contamination and *in vitro* rumen fermentation of normal and genetically modified corn (Cry1A(B)) grown in northern Italy. *Maydica* 44: 205-209
- Mauricio R. M., Owen, E., Dhanoa, M. S., Theodorou, M. K. 1997. Comparison of rumen liquor and faeces from cows as sources of microorganisms for the *in vitro* gas production technique. Proceedings of occasional meeting of British Society of Animal Science, University of Reading, UK.
- Mauricio, R. M., Mould, F. L., Dhanoa, M. S., Owen, E., Channa, K. S., Theodorou, M. K., 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Sci. Technol.* 79:321-330.
- McAllister, T. A., Cheng, K. J. 1996. Microbial strategies in the ruminal digestion of cereal grains. *Anim. Feed Sci. Technol.* 62: 2936-2944.
- McBee, R. H. 1953. Manometric method for the valuation of microbial activity of rumen with application to utilization of cellulose and hemicelluloses. *Appl. Microbiol.* 1:106.
- McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43(1): 99-109.
- Meeus, J. H. A. 1995. Pan-European landscapes. *Landscape and Urban Planning.* 31: 57-79.
- Mehrez, A. Z., Orskov, E. R. 1977. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *J. Agric. Sci. (Cambridge).* 88: 645-650.

- Mendoza, G., Ricalde, R. Y., Alanís, J. 1993 Digestión ruminal del almidón: Factores estructurales y de origen microbial. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 1: 99-110.
- Meng, Q., Kerely, M. S., Ludden, P. A., Belyea, R. L. 1999. Fermentation substrate and dilution rate interact to affect microbial growth and efficiency. *J. Anim. Sci.* 77: 206-214.
- Menke, K.H., Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28: 7-55.
- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., 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. Camb.* 93: 217-222.
- Merry, R. J., McAllan, A. B. 1983. A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta. *Br. J. Nutr.* 50: 701-709.
- Merry, R. J., McAllan, A. B. 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.* 31: 55-64.
- Meyer, J. H. F., Mackie, R. I. 1986. Microbiological evaluation of the intraruminal in sacculus digestion technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 622-629.
- Minato, H., Suto, T. 1978. Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. II. Attachment of bacteria isolated from bovine rumen to cellulose powder *in vitro* and elution of bacteria attached therefrom. *J. Gen. Appl. Microb.* 24: 1-16.
- Minato, H., Suto, T. 1981. Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. IV. Attachment of rumen bacteria to cellulose powder and elution of bacteria attached to it. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 27: 21-31.
- Moe, P. W., Tyrrell, H. F. 1979. Methane production in dairy-cows. *J. Dairy Sci.*, 62: 1583-1586.



- Moss, A. R. 2002. Environmental control of methane production by ruminants. in *Greenhouse Gases and Animal Agriculture*. Takahashi, J., and B. A. Young, (Eds.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Molina-Alcaide, E., Martín, I., Aguilera, J. F. 2000. A comparative study of nutrient digestibility, kinetics of degradation and passage and rumen fermentation pattern in goats and sheep offered good quality diets. *Livest. Prod. Sci.*, 64: 215-223.
- Molina-Alcaide, E., Weisbjerg, M. R., Hvelplund, T. 1996. Degradation characteristics of shrubs and the effect of supplementation with urea or protein on microbial production using a continuous-culture system. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 75: 121-132.
- Molina-Alcaide, E., Yáñez-Ruiz, D. R., Moumen, A., García, A. L. M. 2003. Ruminal degradability and *in vitro* intestinal digestibility of sunflower meal and *in vitro* digestibility of olive by-products supplemented with urea or sunflower meal-comparison between goats and sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 110: 3-15.
- Molina-Alcaide, E., Moumen, A., Martín García, I., Carro, M. D. 2008. Comparison of bacterial pellets and microbial markers for the estimation of the microbial nitrogen and amino acids flows from single flow continuous culture fermenters fed diets containing two-stage olive cake. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 93: 527-537.
- Molina-Alcaide, E., Martín-García, A. I., Moumen, A., Carro, M. D. 2009. Ruminal fermentation, microbial growth and amino acid flow in single-flow continuous culture fermenters fed a diet containing olive leaves. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* Doi: 10.1111/j.1439-0396.2008.00905.x
- Moss, A. R., Jouany, J. P., Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming, *Ann. Zootech.* 49: 231–253.
- Morrison, I. M., Brice, R. E. 1984. The digestion of untreated and ammonia-treated barley straw in an artificial rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:229-238.
- Mould, F. L., Nordheim, H. 1998. Dry matter and NDF degradation profiles of roughages obtained using the ANKOM *in vitro* system. In: *In vitro techniques for measuring nutrient supply to ruminants*. Deaville, E. R., Owen, E., Adesogan, A. T., Rymer, C., Huntingdon, J.A., Lawrence, T.L.J. (Eds). *BSAS Occasional Publication, No 22*: 329-331.

- 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.
- Moumen, A. 2003. Valoración nutritiva, mediante técnicas de simulación, de dietas para pequeños rumiantes basadas en orujo de dos fases u hoja de olivo. Potencial predictivo. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Moumen, A., Yáñez-Ruiz, D. R., Martín-García, A. I., Molina-Alcaide, E. 2008. Fermentation characteristics and microbial growth promoted by diets including two-phase olive cake in continuous fermenters. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92: 9-17.
- Moumen, A., Yáñez-Ruiz, D. R., Carro, M. D., Molina-Alcaide, E. 2009. Protozoa evolution in single-flow continuous culture fermenters and Rusitec fermenters fed high-forage diets. *Options méditerranéennes, Serie A.* No 85: 303-308.
- Moumen, A., Yáñez-Ruiz, D. R., Martín-García, I., Molina-Alcaide, E. 2007. Fermentation characteristics and microbial growth promoted by diets including two-phase olive cake in continuous fermenters. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92: 9-17.
- Muetzel, S., Lawrence, P., Hoffmann, E. M., Becker, K. 2009. Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 151:32-43.
- Murphy, M. R., Baldwin R. L., Koong, L. J. 1982. Estimation of stoichiometric parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 55:279–296.
- Nagadi, S., Herrero, M., Jessop, N.S. 2000. The influence of diet of the donor animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and *in vitro* gas production degradability parameters. 2000. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87, 231-239.
- Nagaraja, T. G., Towne, G. Beharka, A. A. Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed a high grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 210–214.
- Nakamura, K., Kanegasaki, S.. 1969. Densities of ruminal protozoa of sheep established under different dietary conditions. *J. Dairy Sci.* 52:250-255.
- Nakamura, F., Kurihara, Y. 1978. Maintenance of a certain rumen protozoal population in a continuous *in vitro* fermentation system. *Appl. and Env. Microbiol.* 35: 500-506.
- Newbold, J. R., Rust, S. R. 1992. Effect of asynchronous nitrogen and energy supply on growth of ruminal bacteria in batch culture. *J. Anim. Sci.* 70:538–546.

- Newbold, C. J., Wallace, R. J., Chen, X. B., McIntosh, F. M. 1995. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effect on ruminal bacteria numbers *in vitro* and in sheep. *J. Anim. Sci.* 73: 1811-1818.
- Nocek, J. E., Tamminga, S. 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition, *J. Dairy Sci.* 74: 3589–3629.
- Ogimoto, K., Imai, S. 1981. *Atlas of rumen microbiology*. Japan Scientific Societies Press. Tokio, Japan.
- Olobobokun, J. A., Craig, W. M. 1990. Quantity and characteristics of microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J. Anim. Sci.* 68: 3360-3370.
- Olubobokun, J. A., Craig, W. M., Nipper, W. A. 1988. Characteristics of protozoal and bacterial fractions from microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J. Anim. Sci.* 66: 2701-2710.
- Omed, H. M. Lovet, D. K., Axford, R. F. E. 2000. Faeces as a source of microbial enzymes for estimating digestibility. In: *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. Givens, D. I., Owen, E., Omed, H. M., Axford, R. F. E. (Eds.) CAB International, Wallingford, UK
- Opatpatanakit, Y., Kellawya, R., Clean, I. J., Annison, G., Kirby, A. 1994 Microbial fermentation of cereal grains *in vitro*. *Australian Journal of Agricultural Research* 45:1247-1263.
- Orpin, C. G. 1984 The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Animal Feed Sci. Technol.* 10, 121-143.
- Orpin, C. G., Joblin, K. N. 1997. The rumen anaerobic fungi. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Hobson, P.N., Stewart, C.S. (Eds.). Chapman and Hall, London, UK.
- Orpin, C. G., Letcher, A. J. 1978. Some factors controlling the attachment of the rumen Holotrich protozoa *Isotricha intestinalis* and *I. prostoma* to plant particles *in vitro*. *J. Gen. Microb.* 106:33-40.
- Ørskov, E. R. 1982. *Protein Nutrition in Ruminants*. Acad. Press, NY.
- Ørskov, E. R. 1987. *Feeding of Ruminant Livestock, Principle and Practice*. Chalcombe Publications, Marlow, England
- Ørskov, E. R., 1991. Manipulation of fiber digestion in the rumen. *Proc. Nutr. Soc.* 50: 187–196.

- Ørskov, E. R. 2000. New concepts of feed evaluation for ruminants with emphasis on roughages and feed intake., *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 13: 128–136 (Special issue).
- Ørskov, E. R., McDonald, Y. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from determining the digestibility of feeds in the rumen. *Journal Agricultural Science.* 92:499-503.
- Ørskov, E. R., Ryle, M. 1990. *Energy nutrition in ruminants.* Elsevier Applied Sci., Londres and NY.
- Pearson, R. M., Smith J. A. B. 1943. The utilization of urea in the bovine rumen. III. Synthesis and breakdown of protein in rumen ingesta. *Biochem. J.* 37:153-164.
- Pell, A. N., Schofield, P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro.* *J. Dairy Sci.* 76:1063-1073.
- 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* J.D. Brooker (Ed.). ACIAR, Adelaide, Australia .
- Pérez, J. F., Balcells, J., Guada, J. A., Castrillo, C. 1997. Rumen microbial production estimated either from urinary purine derivative excretion or from direct measurements of <sup>15</sup>N and purine bases as microbial markers: effect of protein source and rumen bacteria isolates. *Anim. Sci.* 65: 225-236.
- Pinares-Patiño, C.S., Baumont, R., Martin, C. 2003. Methane emissions by Charolais cows grazing a non-specific pasture of timothy at four stages of maturity. *Canadian Journal of Animal Science* 83:769–777.
- Prevot, S., Senaud, J., Boathier, J., Prensier, G. 1994. Variation in the composition of the ruminal bacterial microflora during the adptation phase in an artificial fermenter (Rusitec). *Zool. Sci.* 11: 871-878.
- Qiu, X., Eastridge, M. L., Griswold, K. E., 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.* 87:3473–3479.
- 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.* 18:91.

- Ranilla, M. J., 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.* 81: 537-544.
- Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Carro, M. D. 2001. Comparación de la fermentación microbiana en el rumen de ovejas y en fermentadores semicontinuos (Rusitec). *ITEA*, Vol. 22 (Extra vol.): 376-378.
- Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Carro, M. D. 2001. Comparación de diferentes métodos para desligar las bacterias ruminales asociadas a la fase sólida de la digesta de un sistema *in vitro* (Rusitec). *ITEA*, Vol. 22 (Extra vol.): 382-384.
- Ramos, S., Yáñez-Ruíz, D., Carro, M. D., Tejido, M. L., Ranilla, M. J., Newbold, C. J. 2008. Shifts in rumen microbial communities in sheep fed either alfalfa hay or grass hay after an abrupt change to a high-concentrate diet. Proc. of the 6th INRA-RRI Symposium: Gut Microbiome. Functionality, Interaction with the Host and Impact on the Environment: 30-31.
- Raskin, L., Capman, W. C., Sharp, R., Poulson, L. K., Stahl, D. A. 1997. Molecular ecology of gastrointestinal systems. In *Gastrointestinal microbiology* Mackie, R. I., White, B. A., Isaacson, R. (Eds.). Chapman and Hall, NY.
- Rechkemmer, G., Gäbel, G., Diernæs, L., Sehested, J., Møller P. D., Engelhardt, W.V. 1995. Transport of short chain fatty acids in the forestomach and hindgut. In: *Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction* Engelhardt, W.V., Leonhard Marek, S. Breves G., Giesecke, D. (Eds.). Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Germany.
- Reilly, K., Caruthers, V. R. Attwood, G. T. 2002. Design and use of 16S ribosomal DNA-directed primers in competitive PCRs to enumerate proteolytic bacteria in the rumen. *Microb. Ecol.* 43:259–270.
- Richards, C. J., Pedersen, J. F., Britton, R. A., Stock, R. A., Krehbiel, C. R. 1995. *In vitro* starch disappearance procedure modifications, *Anim. Feed Sci. Technol.* 55: 35–45.
- Robinson, P. H., Campbell Mathews, M., 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.* 80:257–266.

- Romney, D. L., Blunn, V, Leaver, J. D. 1997. The responses of lactating dairy cows to diets based on grass silage of high or low DM and supplemented with fast and slowly fermentable energy sources. *Proceedings of British Society of Animal Science*, Edimburgh.
- Rotger, A., Ferret, A., Calsamiglia, S., Manteca, X.. 2006. Effects of nonstructural carbohydrates and protein sources on intake, apparent total tract digestibility, and ruminal metabolism *in vivo* and *in vitro* with high-concentrate beef cattle diets. *J. Anim. Sci.* 84:1188–1196.
- Rufener, W. H., Jr., Nelson, W. O., Wolin, M. J. 1963. Maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. *Appl. Microbiol.* 11:196-201.
- Russell, J. B. 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 81: 3222-3230.
- Russell, J. B., Dombrowski, D. B. 1980. Effect of pH on the efficiency of grow by pure cultures of rumen bacteria in continuous cultures. *Appl. Environm. Microbiol.* 39: 604-610.
- Russell, J. B., Strobel, H. J. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1-6.
- Russell, J. B. Strobel, H. J. 1993. Microbial energetics. In *Quantitative Aspects of the Ruminant Digestion and Metabolism*. Forbes, J. M , France, J. D. (Eds.) Wallingford, Oxon.:CAB International.
- Russell, J. B., Bottje, W. G., Cotta, M. A. 1981. Degradation of protein by mixed cultures of rumen bacteria: Identification of *Streptococcus bovis* as an actively proteolytic rumen bacterium. *J. Anim. Sci.* 53:242–252.
- Russell, J. B., O'Connor, J. D., Fox, D. G., Van Soest, P. J., Sniffen, C. J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. I. Ruminal fermentation, *J. Anim. Sci.* 70: 3551–3561.
- 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. *Animal Feed Science and Technology* 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.
- Sadet, S., Martin, C., Meunier, B., Morgavi, D. P. 2007. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* 1: 939–944.
- Sampath, K. T., Wood, C. D., 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.* 67:323–328.
- Santos, K. A., Stern, M. D., Satrer, L. D. 1984. Protein degradation in the rumen and amino acid absorption in the small intestine of lactating dairy cattle fed various protein sources. *J. Anim. Sci.* 58:244-255.
- Santra, A., Karim, S. A., Mishra, A. S., Chaturvedi, O. H., Prasad, R. 1998. Rumen ciliate protozoa and fibre utilization in sheep and goats, *Small Rumin. Res.* 30:13–18.
- Satter L.D., Slyter L. L. 1974. Effect of ammonia concentrations on rumen microbial protein production *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 32: 199-208.
- Schadt, I., Hoover, W. H., Miller-Webster, T. K., Thayne, W. V., Licitra, G. 1999. Degradation of two protein sources at three solids retention times in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 77: 485-491.
- Scheifinger, C. C., Wolin, M. J. 1973. Propionate formation from cellulose and soluble sugars by combined cultures of *Bacteroides succinogenes* and *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Microbiol.* 26: 789–795.
- Schofield, P. 2000. Gas production methods. In: *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. Wallingford. CAB International, UK.
- Shannon, C. E., Weaver, W. 1949. *The mathematical theory of communication*. University Illinois Press. Urbana, IL, USA.
- Shi, Y., Weimer, P. J. 1992. Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture. *Appl. Environm. Microbiol.* 58: 2583- 2591.

- Shriver, B. J., Hoover, W. H., Sargent, J. P., Crawford, R. J. Jr., Thayne, W. V. 1986. Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. *J. Dairy Sci.* 69: 413-419.
- Siaw, D. E. K. A., Osuji, P. O., Nsahlai, I. V. 1993. Evaluation of multipurpose tree germplasm: the use of gas production and rumen degradation characteristics., *J. Agric. Sci., Camb.* 120: 319–330.
- Slyter, L. U, Nelson, W. O., Wolin, M. J. 1964. Modification of a device for maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. *Appl. Microbiol.* 12:374-377.
- Smith, 1973. Nutritive evaluations of animal manures. In: *Processing Agricultural and Municipal Wastes*. G.E. Inglett (Ed.). Avi Publishing, Westport, Connecticut, U.S.A.
- Sniffen, C. J., Robinson, P. H. 1987. Symposium: Protein and fiber digestion, passage and utilization in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 70: 425-433.
- Stahl, D., Flesher, A., Mansfield, H. R., Montgomery, L. 1998. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology, *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1079–1084.
- Steingass, H., Menke, K., 1986. Schätzung des energetischen Futterwertes aus der *in vitro* mit Pansensaft bestimmten Gasbildung und der chemischen Analyse. 1. Untersuchungen zur Methode. *Tierernährung.* 14: 251–270.
- Steinhour, W. D., Stokes, M. R., Clark, J. H., Rogers, J. A. , Davis, C. L. Nelson, D. R. 1982. Estimation of the proportion of non-ammonia nitrogen reaching the lower gut of the ruminant derived from bacterial and protozoal nitrogen. *Br.J. Nutr.* 48:417.
- Stern, M. D., Hoover, W. H. 1979. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: a review. *J Anim. Sci.* 49: 1590-1603.
- Stern, M. D., Bach, A., Calsamiglia, S. 2006. New concepts in protein nutrition of ruminants. Pages 45-66 in Proc. 21st Annual Southwest Nutrition and Management Conf., Tempe, AZ. University of Arizona, Tucson.
- Stern, M. D., Santos, K. A., Satter, L. D. 1985. Protein degradation in tureen and amino acid absorption in small intestine of lactating dairy cattle fed heat treated whole soybeans. *J. Dairy Sci.* 68:45-46.
- Stern, M. D., Calsamiglia, S., Endres, M. I. 1994. Dinámica del metabolismo de los hidratos de carbono y del nitrógeno en el rumen. En: *Nuevos sistemas de valoración*



- de alimentos y programas alimenticios para especies domésticas*. Ed. FEDNA, Madrid.
- Stevani, J., Durand, M., Zanchi, R., Beaumatin, P., Hannequart, G. 1992. Effects of sulphate supplementation of untreated and alkali-treated wheat straws on ruminal fermentation and microbial protein synthesis in a semi-continuous fermentor. *Anim. Feed Sci. and Technol.* (Netherlands). 36: 287-301
- Stevenson, A., Buchanan, C. J., Abia, R., 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.* 73: 101–105.
- Stewart, C. S. Bryant, M. P. 1988. The rumen bacteria. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Hobson, P.N., Stewart, C. S. (Eds.). Elsevier Science Publishing Co., Inc., NY.
- Susmel, P., Stefanon, B. 1993. Aspects of lignin degradation by rumen microorganisms. *J. Biotechnol.* 30:141-148.
- Strobel, E., Seeling, K., Tebbe, C. C. 2008. Diversity of responses of rumen microbial communities to Fusarium- contaminated feed, evaluated with rumen simulating technology (Rusitec). *Environ. Microbiol.* 10: 483-496.
- Stück, K., Faul, K., Hylla, S., Stein, J., Breves, G. 1995. The application of a semi-continuous colon simulation technique (Cositec) for studying the effects of clindamycin on microbial hindgut metabolism. *Z. Gastroenterol.* 33: 241-246.
- Sylvester, J. T., Karnati, S. K. R., Dehority, B. A., Morrison, M., Smith, G. L., St-Pierre, N. R., Firkins, J. L. 2009. Rumen ciliated protozoa decrease generation time and adjust 18S ribosomal DNA copies to adapt to decreased transfer interval, starvation, and monensin. *J. Dairy Sci.* 92: 256-269.
- Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsul, H., Nakamura, M., Benno, Y. 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl. Environm. Microbiol.* 67: 2766-2774.
- Tamminga, S., Doreau, M. 1991. Lipids and rumen digestion. In: *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion* Jouany, J.P. (Ed.) INRA, Paris. France.

- Tapia, M. O., Stern, M. D., Koski, R. L., Bach, A., Murphy, M. J. 2002. Effects of patulin on rumen microbial fermentation in continuous culture fermenters, *Anim. Feed Sci. Technol.* 97: 239–246.
- Tappeiner, G. 1884. Untersuchungen Über die Gfiring der Cellulose insbesondere Über deren Losung im Dannkanale. *Z. Biol.* 52: 134.
- Tappeiner, G. 1882. Vergleichende Untersuchung der Darmgase. *Zeitschrift für Physiologische Chemie.* 6: 432-479.
- Taylor, K. 1995. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 56: 49-58.
- Teather, R. M., Sauer, F. D. 1988. A naturally compartmented rumen simulation system for the continuous culture of rumen bacteria and protozoa. *J. Dairy Sci.* 71: 666–673.
- Tejido, M. L., Ranilla, M. J., Carro, M. D. 2002. *In vitro* digestibility of forages as influenced by source of inoculum (sheep rumen *versus* Rusitec fermenters) and diet of the donor sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 97: 41–51.
- Tejido, M. L., Carro, M. D., Ranilla, M. J., López, S., Arín, M. J., Díez, M. T. 2001. Utilización de <sup>15</sup>N y bases púricas como marcadores para estimar la síntesis microbiana *in vitro*. *ITEA*, Vol. 22 (Extra): 385-387.
- Teresa, G. W. 1959. The development of an *in vivo* artificial rumen. Ph.D. Thesis. Kansas State University, Manhattan, Kansas.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., Meallan, A. B., France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Sci. and Technol.* 48:185-197.
- Thomas, P. C., Rook, J. A. F. 1981. Manipulation of rumen fermentation. In: *Recent Developments in Ruminant Nutrition* W. Haresign and D.J.A. Cole (Eds.). Butterworths, London.
- Tilley, J., Terry, R. A. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Brit. Grassl. Soc.* 18:104-108.
- Tilley, J. M. A., Terry, R. A. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Grass and forage science* 18: 104-111.
- Tokura, M., Ushida, K., Miyazaki, K. Koima, Y. 1997. Methanogens associated with rumen ciliates, *FEMS Microbiol Eco.* 22: 137–143.

- Towne, G., Nagaraja, T. G., Brandt, R. T., Jr., Kemp, K. E. 1990. Ruminant ciliated protozoa in cattle fed finishing diets with or without supplemented fat. *J. Anim. Sci.* 68: 2150–2155.
- Trabalza-Marinucci, M., Poncet, C., Delval, E., Fonty, G. 2005. Evaluation of techniques to detach particle-associated microorganisms from rumen contents. *Anim. Feed Sci. Technol.* 125: 1-16.
- Trei, J. E., Singh, Y. K., Scott, G. C. 1970. Effect of methane inhibitors on rumen metabolism. *J. Anim. Sci.* 31:256.
- Ushida, K., Kayouli, C., De Smet, S., Jouany, J. P. 1990. Effect of defaunation in protein and fibre digestion in sheep fed on ammonia-treated straw-based diets with or without maize. *British Journal of Nutrition.* 64: 765-775.
- Van Houter, M. F. J. 1993 The production and metabolism of volatile fatty acids by ruminants fed roughages. A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 43:189-225.
- Van Kessel, J. S., Russell, J. B. 1996. The effect of amino-nitrogen on the energetics of ruminal bacteria and its impact on energy spilling. *J. Dairy Sci.* 79: 1237-1243.
- Van Nevel, C. J., Demeyer, D. I. 1988. Manipulation of rumen fermentation. In: *The rumen microbial ecosystem.* Hobson, P. N. (Ed.). Elsevier Applied Sciences, London.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant.* Cornell University Press, Ithaca, NY.
- 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.
- Verbic, J. 2002. Factors affecting microbial protein synthesis in the rumen with emphasis on diets
- Viera, D. M. 1986. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. *J. Anim. Sci.* 63: 1547-1560.
- Veth de, M. J., Kolver, E. S. 2001. Digestion of ryegrass pasture in response to change in pH in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 84: 1449-1457.
- Vlaeminck, B., Fievez, V., Demeyer, D., Dewhurst, R. J. 2006. Effect of forage:concentrate ratio on fatty acid composition of rumen bacteria isolated from ruminal and duodenal digesta. *J. Dairy Sci.* 89: 2668-2678.

- Vogel, R. F., Knorr, R., Müller, M. R. A., Steudel, U., Gaänzle, M. G., Ehrmann, M. 1999. Non-dairy lactic fermentations: the cereal world. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76, 403–411.
- Waghorn, G. C., Clark, H., Taufa, V., Cavanagh, A. 2008. Monensin controlled-release capsules for methane mitigation in pasture-fed dairy cows, *Aust. J. Exp. Agric.* 48: 65–68.
- Warner, A. C. I. 1956. Criteria for establishing the validity of *in vitro* studies with rumen micro-organisms in the so-called artificial rumen systems. *J. Gen. Microbiol.* 14:748.
- Warner, A. C. I. 1965. Factors influencing numbers and kinds of micro-organisms in the rumen. In *Physiology of Digestion in the Ruminant*. R. W. Dougherty (ed.) Tutterworths, Washington, D.C.
- 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.* 45:213-235.
- 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.* 45:237-242.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*. 89: 971-974.
- Wegner, M. I., Booth, A. N., Bohstedt, G. Hart, E. B. 1940. The *in vitro* conversion of inorganic nitrogen to protein by microorganisms from cow's rumen. *J. Dairy Sci.* 23:1123-1129.
- Weimer, P. J. 1998. Manipulating ruminal fermentation: a microbial perspective, *J. Anim. Sci.* 76: 3114–3122.
- Weiss, W. P., 1994. Estimation of digestibility of forages by laboratory methods. In: *Forage Quality, Evaluation and Utilization*. George, C., Fahey, J. (Eds.). Madison, USA,
- Weller, R., 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.* 32:341–351.
- Weston, R. H., Hogan, J. P. 1968. The digestion of pasture plants by sheep. I. Ruminant production of VFA by sheep offered diets of rye grass and forage oats. *Aust. J. Agric. Res.* 19: 418–419.

- Whitehouse, N. L., Olson, V. M., Schwab, C. G., Chesbro, W. R., Cunningham, K. D., Lykos, T. 1994. Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. *J. Anim. Sci.* 72: 1335-1343.
- Whitford, M. F., Teather, R. M., Forster, R. J. 2001. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiol.* 1, 5.
- Whitford, M. F., Foster, R. J., Beard, C. E., Cong, J., Teather, R. M. 1998. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe.* 4: 153-163.
- Wilkins, J. R. 1974. Pressure transducer method for measuring gas production by microorganisms. *Appl. Microbiol.* 27:135-140.
- Williams, A. G. 1986. Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiol. Rev.* 50: 25-49.
- 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.). CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Williams, A. G., Coleman, G. S. 1992. *The Rumen Protozoa*. Springer-Verlag. NY, USA.
- Williams, A. G., Strachan, N. H. 1984. Polysaccharide degrading enzymes in microbial populations from the liquid and solid fractions of bovine rumen digesta. *Can. J. Anim. Sci.* 64 (Suppl. 1): 58-59.
- Williams, B. A., Tamminga, S., 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.
- Williams, P. P., Davis, R. E., Doetsch, R. N., Gutierrez, J. 1961. Physiological studies of the rumen protozoa *Ophryoscolex caudatus* Eberlein. *Appl. Microbiol.* 9: 405-409.
- Windschitl, P. M. 1992. Effects of probiotic supplementation of hull-less barley- and corn-based diets on bacterial fermentation in continuous culture of ruminal contents. *Can. J. Anim. Sci.* 72: 265-272.
- Wood, T. M., Bhat, K. M. 1988. Methods for measuring cellulose activities. *Methods in Enzymology.* 160: 87-112.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- Wolin, M. J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.* 43:1452-1459.

- Wolin, M. J., Miller, T. L. 1983. Carbohydrate fermentation. In: *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*. Hentges, D. J. (Ed.). Academic Press, London, UK.
- Wolin, M. J., Miller, T. L., Stewart, C. S. 1997. Microbe-microbe interactions. In: *The Rumen Microbial Ecosystem* Hobson, P. N., Stewart, C. S. (Eds.) Blackie Academic and Professional, London.
- Wood, J., Scott, K. P., Avgustin, G., Newbold, C. J., Flint, H. J. 1998. Estimation of the relative abundance of different *Prevotella* ribotypes in gut samples by restriction enzyme profiling of PCR amplified 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol* 64: 3683-3689.
- Woodman, H. E., 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.* 28:43-63.
- Yan, T., Mayne, C. S., Porter, M. G., 2006. Effects of dietary and animal factors on methane production in dairy cows offered grass silage-based diets. *Int. Congr.* 1293: 123– 126.
- Yang, W. Z., Beauchemin, K. A., Rode, L. M. 2001. Effect of dietary factors on distribution and chemical composition of liquid- or solid-associated bacterial populations in the rumen of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 79: 2736-2746.
- Yang, W. Z., Beauchemin, K. A., Vedres, D. D. 2002. Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 102: 137-150.
- Yang, W. Z., Beauchemin, K. A., Vedres, D. D. 2002. Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 102:137–150.
- Yang, C. M. J., Huang, S. C. Chang, T., Cheng Y. H., Chang, C. T. 2004. Fermentation acids, aerobic fungal growth, and intake of napiergrass ensiled with nonfiber carbohydrates, *J. Dairy Sci.* 86: 630–636.
- Yokohama, M. T., Johnson, K. A. 1988. Microbiology of the rumen and intestine. In: *The ruminant animal. Digestive physiology and nutrition*. Church, D.C. (Ed.). Prentice Hall. NJ. USA.

- Yu, Z., Morrison, M. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and faecal 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, *Environ. Microbiol.* 2: 632–643.
- Zuntz, N. 1891. Bemerkungen fiber die Verdauung und den Niihrwerth der Cellulose. *Arch. Ges. Physiol.* 49:477.