

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA



**ESTUDIO DE LA UTILIZACIÓN DE NUTRIENTES, DE LA  
FERMENTACIÓN Y DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN  
EL RUMEN DE CAPRINO Y EN FERMENTADORES DE FLUJO  
CONTINUO SIMPLE. EFECTO DE LA CANTIDAD DE  
CONCENTRADO EN LA DIETA.**



**GONZALO CANTALAPIEDRA HIJAR**

Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal  
Estación Experimental del Zaidín (CSIC)  
Granada, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Gonzalo Cantalapedra Híjar  
D.L.: GR. 3084-2009  
ISBN: 978-84-692-5113-3



Este trabajo se ha realizado en el marco del Proyecto de Investigación CICYT-FEDER, AGL 2004-04755-CO2-02/GAN. El licenciado Gonzalo Cantalapiedra Hajar ha disfrutado de una beca-contrato FPU concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación para el período 2005-2009.



Los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral, titulada “Estudio de la utilización de nutrientes, de la fermentación y de las comunidades microbianas en el rumen de caprino y en fermentadores de flujo continuo simple. Efecto de la cantidad de concentrado en la dieta” han sido realizados bajo nuestra dirección por el Licenciado Gonzalo Cantalapiedra Hajar para aspirar al grado de Doctor. Esta memoria refleja fielmente los resultados obtenidos.

Dra. Eduarda Molina Alcaide  
Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal  
Estación Experimental del Zaidín (CSIC)  
Granada.

Dr. David Rafael Yáñez Ruiz  
Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal  
Estación Experimental del Zaidín (CSIC)  
Granada.

Licenciado Gonzalo Cantalapiedra Hajar  
Granada 2009.



Parte de los resultados expuestos en la presente Memoria de Tesis Doctoral se recogen en los siguientes trabajos:

- **Cantalapiedra-Hijar G.**, Martín-García A.I., Moumen A., Molina-Alcaide E. 2007. Fermentación ruminal en caprino y en fermentadores de flujo continuo promovida por dietas con distintas proporciones de heno de alfalfa y concentrado. **ITEA, Vol. Extra nº 28 (I), 120-122.**
- **Cantalapiedra-Hijar G.**, Molina-Alcaide E., Yáñez-Ruiz D.R. 2007. Diversidad bacteriana en el rumen de cabras y en fermentadores de flujo continuo analizada mediante DGGE. **Avances Metodológicos en el Estudio de la Microbiología Digestiva, 10-11.**
- **Cantalapiedra-Hijar G.**, Yáñez-Ruiz D.R., Martín-García A.I., Molina-Alcaide E. 2009. Effects of forage to concentrate ratio and roughage source on apparent digestibility, ruminal fermentation and microbial growth in goats. **Journal of Animal Science, 87:622-631.**
- Molina-Alcaide E., Pascual M.R., **Cantalapiedra-Hijar G.**, Morales-García E.Y., Martín-García I. 2009. Effects of concentrate replacement by feed blocks on the ruminal fermentation and microbial growth in goats and single-flow continuous-culture fermenters. **Journal of Animal Science, 87: 1321-1333.**
- **Cantalapiedra-Hijar G.**, Yáñez-Ruiz D.R., Molina-Alcaide E. 2009. Evaluation of the ability of single-flow continuous-culture fermenters to simulate the effects of forage type and forage to concentrate ratio on goats ruminal fermentation. **Journal of Animal Science. En revisión.**
- **Cantalapiedra-Hijar G.**, Yáñez-Ruiz D.R., Newbold C.J., Molina-Alcaide E. 2009. Can rumen-simulating continuous-culture fermenters sustain a similar bacterial community structure and size to that established in the goats rumen? **Environmental microbiology. Enviado**



- **Cantalapiedra-Hijar G.**, Yáñez-Ruiz D.R., Molina-Alcaide E. (2009). Estudio comparativo de los efectos del tipo de forraje y de la proporción forraje-concentrado sobre la fermentación ruminal en cabras y en fermentadores de flujo simple-continuo. En **XIII Jornadas sobre Producción Animal AIDA**. M. Joy, J. H. Calvo, C. Calvete, M. A. Latorre, I. Casasús, A. Bernués, B. Panea, A. Sanz, J. Balcells (Eds.). AIDA, Zaragoza. 316-318. ISBN-13-978-84-613-2311-1
  
- **Cantalapiedra-Hijar G.**, Yáñez-Ruiz D.R., Newbold C.J., Molina-Alcaide E. (2009). Estudio molecular de las comunidades bacterianas del rumen de caprino y de fermentadores de flujo simple continuo. En **XIII Jornadas sobre Producción Animal AIDA**. M. Joy, J. H. Calvo, C. Calvete, M. A. Latorre, I. Casasús, A. Bernués, B. Panea, A. Sanz, J. Balcells (Eds.). AIDA, Zaragoza. 763-765. ISBN-13-978-84-613-2311-1

## AGRADECIMIENTOS

Como dice el refrán “Es de bien nacidos ser agradecido” y yo por suerte se lo estoy a multitud de personas que me han ayudado a completar esta etapa de mi formación, de la que guardo un grato recuerdo. Deseo expresar mi más sincera gratitud a las siguientes personas:

A mi directora Eduarda Molina Alcaide por tu interés, dedicación y trabajo, que me han permitido no solo concluir esta tesis doctoral sino aprender que la constancia tiene sus frutos. Gracias por dejarme, hace ya cinco años, entrar a forma parte de tu grupo aún cuando el “equilibrio de sexos” te hacía pensar en incorporar a una estudiante.

A mi director David Yáñez Ruiz por dirigirme y aconsejarme desde el exilio y posteriormente “in situ”. Gracias por ensañarme ese espíritu crítico tan necesario en investigación y por ofrecer tu ayuda en otros menesteres colaterales a la realización de una tesis.

A Manuel Pérez Hernández por “empujarme” al apasionante mundo de la investigación, por ser una persona cercana y humilde que me ha tendido la mano siempre que lo he necesitado.

A Manuel García Gallego por ejercer de tutor de investigación y facilitarme al máximo el trabajo burocrático que conlleva el final de una tesis.

A Julia y a Victor, porque sin vosotros este trabajo no hubiera acabado nunca, porque me habeis mimado demasiado. A Tamara por tu buen hacer con los púricos, por tu amistad. A Isa por ayudarme con esas extracciones de ADN a toda “pastilla”. A Elisabeth, Mari Carmen, María, Silvia, Luis y Manolo, por colobarar en este trabajo echando mil manos.

A mis compañeros de la sala de becarios en especial a Rosa, Gloria y Jose Ramón por acogerme tan bien a mi llegada. A los que habeis seguido viniendo y promoviendo el “buen rollo” que ahí se respira.

A Marta, Eva y David, por influirme tan decisivamente en el devenir de mi tesis, porque sin vosotros otro cantar hubiera sido, gracias de corazón.

A mis predecesores en el puesto, a Abdel, por regalarme anécdotas e historias que han hecho el trabajo más ameno y me han permitido conocer tu cultura “approfondi”. Gracias a Ignacio por tus sugerencias y ayuda en la edición de esta tesis y por nuestras pláticas acerca del modelo ideal de fermentador. A los que me siguen, Eva Cristina y Manolo, por compartir inquietudes propias de nuestro comienzo, por hacerme reir cuando lo he necesitado.

A Rafael Hueso, Juan Vera y Paco Funes, por estar siempre dispuestos a resolver los problemillas de los chancillitas como yo. Por esos maravillosos años de castañuela, pepes y demás chupetes.

A Paqui por ayudarme y enseñarme todo lo relacionado con las referencias bibliograficas, a Remedios por prestarme cuantas veces he necesitado las revistas y tesis de tu despacho, a Matilde por dejarme ese “macro” microscopio para retratar a los señores protozoos.

Al resto del Instituto, que a día de hoy sigue formandose en Nutrición Animal, por crear un ambiente propicio de compañerismo, por sentirse uno como en su casa. A Ignacio Fernández-Figares y a Rosa Nieto, por asesorarme con tan buen criterio en las cuestiones del HPLC. A Luis Lara y Alejandro Morales, porque me habeis resuelto mas de un problema estadístico e informático. A Pedro, Ricardo y Antonio por facilitarme mi trabajo fuera de horario, por compartir alguna comida o desayuno de domingo.

Al grupo de Rogelio Nogales por permitirme hacer manitas con la técnica de la DGGE. Al grupo de baloncesto de la EEZ, Alfonso, Jabi, Iván, Samuel, Mario, Carlos, etc. por compartir buenos momentos de pachanga y cerveza.

A mis tutores de estancias, Jeff Firkins, Manuel Gonzalez Ronquillo y Jamie Newbold, por abrirme los brazos y permitirme aprender de vosotros. Thank you.

A la “mafia latina” de Columbus: Ale, Abelardo, Martín, Rebecca, Carine, Claudio, Rachel, Hector, Andrés, Esbal y Yadira, por acogerme tan calidamente y haberme hecho pasar tan buenos momentos en la city. A mis compadritos toluqueños: Carlos, José, Jorge, Pirrus, Güero y Luis, por aleccionarme en el arte de los albuces mexicanos más picantes. A la gente de Aberystwyth en especial a Helen, Beatriz, Eric, Tina, Gary, Hillary, Graciela, Miguel y Hugo por hacer de mi estancia y la de mi familia un período tan agradable en Gales.

A esos amigos que siempre están y estarán ahí para apoyarle a uno: a mis compañeros de promoción, Fernando y Juanma, a los tres mosqueteros erasmus, Diego, Alberto y Fernando, a mis amigos del barrio, Jose Carlos “el amigo”, Guille, Frasco, Pablo, Jose Carlos, Antonio, Victor etc. A mis compañeros de tesis, Euge, Gabi y Belanche. A Vicky, Inma, Mariano y Paco.  
Gracias a todos.

A LA familia, en especial a ti Mama, que de la nada lo has hecho todo. Gracias por tu sacrificio, amor y apoyo constante. A mis hermanos, Anjara y Nando, y a sus parejas, Iván y Mari, porque vuestra empatía y cercanía han sido suficientes para mí. A mis niñas Nerea y Ainara porque jugando con vosotras me he evadido de todo, me he sentido otra vez niño. A Selina, porque eres más que una tía para mi, por tu ayuda en tantas cosas. A mis abuelos, Pepe y Selina, por vuestro cariño. A la familia mexicana, Manuel y Trini y a todos sus hijos y nietos, por quererme tanto y apoyarme desde el otro lado del charco. A Janeth, mi flaquita, porque siempre te has interesado por mi trabajo con gran pasión.

A MI familia, Anabel y Aitana, estimulo continuo y motor incansable en la realización de esta tesis. Amores, gracias por haber sido tan comprensivas durante estos años y haberme acompañado en esta aventura dando lo mejor de vosotras. Os quiero.

*Ciencia es el arte de crear ilusiones convenientes, que el necio acepta o disputa, pero de cuyo ingenio goza el estudioso, sin cegarse ante el hecho de que tales ilusiones son otros tantos velos para ocultar las profundas tinieblas de lo insondable.*

**Karl Gustav Jung**



*A mis dos amores, Anabel y Aitana.*



## INDICE GENERAL

|  | <u>Páginas</u> |
|--|----------------|
| <b>CAPÍTULO 1. Introducción y objetivos</b>  |                |
| 1.1. Introducción / <i>Introduction</i>  | 1              |
| 1.2. Objetivos / <i>Objectives</i>   | 7              |
| <b>CAPÍTULO 2. Revisión bibliográfica</b>  |                |
| 2.1. El sector caprino y su alimentación   | 9              |
| 2.1.1. Censo y producciones  | 9              |
| 2.1.2. Estado actual y evolución previsible de la producción caprina   | 11             |
| 2.1.3. Alimentación del ganado caprino   | 14             |
| 2.1.3.1. Efectos de la utilización de concentrado en la alimentación del ganado caprino                          | 15             |
| 2.1.3.2. Estrategias para reducir el consumo de cereales en la alimentación del ganado caprino                   | 20             |
| 2.1.3.3. Peculiaridades fisiológicas y de comportamiento alimenticio del ganado caprino frente a otros rumiantes | 21             |
| 2.2. Fermentación ruminal y síntesis de proteína microbiana  | 23             |
| 2.2.1. Fermentación ruminal  | 23             |
| 2.2.2. Síntesis de proteína microbiana   | 27             |
| 2.2.2.1. Marcadores microbianos  | 29             |
| 2.2.2.2. Excreción de derivados púricos en orina   | 36             |
| 2.3. Simulación <i>in vitro</i> de la fermentación ruminal   | 40             |
| 2.4. Estudio del ecosistema ruminal  | 51             |
| 2.4.1. Técnicas moleculares basadas en el gen ARNr 16S   | 53             |
| 2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)   | 55             |
| 2.4.3. Librería de clones  | 57             |
| 2.4.4. Técnicas de caracterización microbiana o "fingerprinting"   | 58             |
| 2.4.4.1. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante/temperatura (DGGE/TGGE)                            | 58             |
| 2.4.4.2. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP)                        | 61             |
| 2.4.4.2.1. Identificación de la composición microbiana por T-RFLP  | 65             |
| 2.4.5. Técnicas cuantitativas  | 66             |
| 2.4.5.1. PCR cuantitativa  | 66             |
| 2.4.5.2. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH)  | 69             |
| <b>CAPÍTULO 3. Material y métodos</b>  |                |
| 3.1. Dietas  | 71             |
| 3.2. Animales  | 71             |
| 3.2.1. Construcción e implantación quirúrgica de las canulas ruminales   | 72             |



|  |    |
|--|----|
| 3.3. Fermentadores   | 73 |
| 3.4. Desarrollo experimental   | 75 |
| 3.4.1. Ensayos <i>in vivo</i>  | 75 |
| 3.4.1.1. Experimento 1   | 75 |
| 3.4.1.2. Experimento 2   | 77 |
| 3.4.2. Ensayos <i>in vitro</i>   | 80 |
| 3.4.2.1. Experimento 1   | 80 |
| 3.4.2.2. Experimento 2   | 80 |
| 3.5. Técnicas experimentales y analíticas  | 83 |
| 3.5.1. Preparación de las muestras   | 83 |
| 3.5.2. Extracción del ADN  | 84 |
| 3.5.3. T-RFLP  | 84 |
| 3.5.3.1. Amplificación del ADN mediante PCR                                      | 84 |
| 3.5.3.2. Purificación del producto de la PCR                                     | 86 |
| 3.5.3.3. Digestión enzimática del ADN amplificado y<br>preparación de la muestra | 87 |
| 3.5.3.4. Análisis de los fragmentos terminales de<br>restricción                 | 89 |
| 3.5.3.5. Identificación bacteriana   | 91 |
| 3.5.4. DGGE  | 92 |
| 3.5.4.1. Amplificación del ADN mediante PCR                                      | 92 |
| 3.5.4.2. Electroforesis  | 93 |
| 3.5.4.3. Tinción, visualización y análisis de bandas                             | 93 |
| 3.5.5. PCR cuantitativa  | 94 |
| 3.6. Tratamiento estadístico   | 96 |

## **CAPÍTULO 4. Publicaciones**

|   |     |
|---|-----|
| 4.1. Publicación 1. “Effects of concentrate replacement by feed blocks on ruminal fermentation and microbial growth in goats and single-flow continuous-culture fermenters”                       | 97  |
| 4.2. Publicación 2. “Effects of forage:concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation and microbial growth”  | 113 |
| 4.3. Publicación 3. “ Evaluation of the ability of single-flow continuous-culture fermenters to simulate the effects of forage type and forage to concentrate ratio on goat ruminal fermentation” | 125 |
| 4.4. Publicación 4. “ Diversidad bacteriana en el rumen de cabras y fermentadores de flujo simple continuo analizada mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)         | 151 |
| 4.5. Publicación 5. “ Can rumen-simulatin continuous-culture fermenters sustain a similar bacterial community structure and size to that established in the goats rumen”                          | 159 |

**CAPÍTULO 5. Discusión**

|   |     |
|---|-----|
| 5.1. Potencial de los fermentadores para simular la fermentación ruminal del ganado caprino | 191 |
| 5.1.1. Composición química de las fracciones bacterianas y síntesis de proteína microbiana  | 200 |
| 5.1.2. Estudio de las comunidades bacterianas presentes en el rumen y en fermentadores      | 207 |
| 5.1.3. Digestibilidad de los nutrientes   | 210 |
| 5.2. Efectos de la disminución de la cantidad de concentrado en la dieta del ganado caprino | 214 |
| 5.2.1. Efectos sobre la fermentación ruminal  | 215 |
| 5.2.2. Efectos sobre la síntesis de proteína microbiana                                     | 221 |
| 5.2.3. Digestibilidad y balance de nutrientes   | 226 |

**CAPÍTULO 6. Conclusiones**

|  |     |
|--|-----|
| 6.1. Conclusiones / <i>Conclusions</i> | 231 |
|--|-----|

**CAPÍTULO 7. Resumen - Abstract**

|                                |     |
|--------------------------------|-----|
| 7.1. Resumen / <i>Abstract</i> | 235 |
|--------------------------------|-----|

**CAPÍTULO 8. Bibliografía**

|                   |     |
|-------------------|-----|
| 8.1. Bibliografía | 245 |
|-------------------|-----|



**LISTADO DE ABREVIATURAS**

|                      |  |
|----------------------|--|
| <b>A</b>             | alfalfa hay  |
| <b>AA</b>            | aminoácidos  |
| <b>AC</b>            | dieta basada en heno de alfalfa y concentrado (exp. 1)         |
| <b>AC</b>            | dieta basada en 30% heno de alfalfa y 70% concentrado (exp. 2) |
| <b>ACBI</b>          | dieta basada en heno de alfalfa, concentrado y bloque I        |
| <b>ACBII</b>         | dieta basada en heno de alfalfa, concentrado y bloque II       |
| <b>ADF</b>           | acid detergent fibre   |
| <b>ADL</b>           | acid detergent lignine   |
| <b>ADN</b>           | ácido desoxiribonucleico                                       |
| <b>ADNr</b>          | ADN ribosómico   |
| <b>AGV</b>           | ácidos grasos volátiles  |
| <b>AF</b>            | dieta basada en 70% heno de alfalfa y 30% concentrado          |
| <b>AFLP</b>          | amplified fragment length polymorphism                         |
| <b>ANOVA</b>         | analysis of variance   |
| <b>ARC</b>           | agricultural Research Council                                  |
| <b>ARDRA</b>         | amplified rDNA restriction analysis                            |
| <b>ARN</b>           | ácido ribonucleico   |
| <b>ARNr</b>          | ácido ribonucleico ribosómico                                  |
| <b>BAL</b>           | bacterias asociadas a líquido                                  |
| <b>BAS</b>           | bacterias asociadas a sólido                                   |
| <b>BE</b>            | bacterias del efluente   |
| <b>bp</b>            | base pair  |
| <b>BP</b>            | bases púricas  |
| <b>BP:N</b>          | relación bases púricas:nitrógeno                               |
| <b>BW</b>            | body weight  |
| <b>C</b>             | dietas ricas en concentrado (exp. 2)                           |
| <b>CAP</b>           | community analysis package                                     |
| <b>CCF</b>           | continuous culture fermenters                                  |
| <b>CNF</b>           | carbohidratos no fibrosos                                      |
| <b>CONC</b>          | concentrate  |
| <b>CP</b>            | crude protein  |
| <b>C<sub>T</sub></b> | cycle threshold  |
| <b>CTSOC</b>         | crude two-stage olive cake                                     |

|                |   |
|----------------|---|
| <b>DA</b>      | discriminant analysis                                   |
| <b>DAPA</b>    | diamonopimelic acid                                     |
| <b>DFCCF</b>   | dual flow continuous culture fermenters                 |
| <b>DGGE</b>    | denaturing gradient gel electrophoresis                 |
| <b>DM</b>      | dry matter  |
| <b>DNA</b>     | desoxirribonucleic acid                                 |
| <b>DNI</b>     | digestible nitrogen intake                              |
| <b>DOMI</b>    | digestible organic matter intake                        |
| <b>DP</b>      | derivados púricos                                       |
| <b>DvMO</b>    | digestibilidad verdadera de la materia orgánica         |
| <b>DvMS</b>    | digestibilidad verdadera de la materia seca             |
| <b>EB</b>      | energía bruta y effluente bacteria                      |
| <b>EDTA</b>    | ethylenediaminetetraacetic acid                         |
| <b>EE</b>      | extracto etéreo   |
| <b>EEM</b>     | error estándar de la media                              |
| <b>EM</b>      | energía metabolizable                                   |
| <b>Exp</b>     | experimento   |
| <b>F</b>       | dietas ricas en forraje (exp. 2)                        |
| <b>FAD</b>     | fibra ácido detergente                                  |
| <b>FAO</b>     | food and agriculture organization of united nations     |
| <b>FAOSTAT</b> | FAO statistical database                                |
| <b>FB</b>      | feed block  |
| <b>F:C</b>     | relación forraje:concentrado                            |
| <b>FFC</b>     | fermentadores de flujo continuo                         |
| <b>FFCD</b>    | fermentadores de flujo continuo doble                   |
| <b>FFCS</b>    | fermentadores de flujo continuo simple                  |
| <b>FISH</b>    | fluorescent in situ hybridization                       |
| <b>FND</b>     | fibra neutro detergente                                 |
| <b>FNM</b>     | flujo de nitrógeno microbiano                           |
| <b>FNNA</b>    | flujo de nitrógeno no amoniacal                         |
| <b>FTR</b>     | fragmentos terminales de restricción                    |
| <b>G</b>       | grass hay   |
| <b>GC</b>      | dieta basada en 30% heno de gramíneas y 70% concentrado |
| <b>G + C</b>   | guanina + citosina                                      |
| <b>GF</b>      | dieta basada en 70% heno de gramíneas y 30% concentrado |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>GLM</b>              | general linear model  |
| <b>HPLC</b>             | high performance liquid chromatography                          |
| <b>INRA</b>             | institute national de la recherche agronomique                  |
| <b>LAB</b>              | liquid associated bacteria                                      |
| <b>LAD</b>              | lignina ácido detergente  |
| <b>MiCA</b>             | microbial community análisis                                    |
| <b>MNF</b>              | microbial nitrogen flow   |
| <b>MO</b>               | materia orgánica  |
| <b>MS</b>               | materia seca  |
| <b>MSb´</b>             | materia seca de la saliva artificial corregida                  |
| <b>MSe</b>              | materia seca del efluente                                       |
| <b>MSE</b>              | microbial synthesis efficiency                                  |
| <b>MSm</b>              | materia seca microbiana   |
| <b>MSs</b>              | materia seca suministrada                                       |
| <b>N</b>                | nitrógeno   |
| <b>NAN</b>              | non ammonia nitrogen  |
| <b>N<sub>BACT</sub></b> | nitrógeno de las bacterias                                      |
| <b>NDF</b>              | neutral detergent fibre   |
| <b>N<sub>EF</sub></b>   | nitrógeno de los efluentes                                      |
| <b>NFC</b>              | non fibrous carbohydrates                                       |
| <b>NNA</b>              | nitrógeno no amoniacal  |
| <b>N-NH<sub>3</sub></b> | nitrógeno amoniacal   |
| <b>NRC</b>              | national research council                                       |
| <b>OM</b>               | organic matter  |
| <b>pb</b>               | pares de bases  |
| <b>PB</b>               | purine bases  |
| <b>p/v</b>              | porcentaje peso/volumen   |
| <b>PVC</b>              | polyvinyl chloride  |
| <b>PD</b>               | purine derivatives  |
| <b>PDI</b>              | proteína digestible en el intestino                             |
| <b>PDIE</b>             | proteína digestible en el intestino con limitación de energía   |
| <b>PDIN</b>             | proteína digestible en el intestino con limitación de nitrógeno |
| <b>PAC</b>              | politica agraria comunitaria                                    |
| <b>PAT</b>              | phylogenetic analysis tool                                      |
| <b>PCA</b>              | principal components análisis                                   |

|                |   |
|----------------|---|
| <b>PCR</b>     | polimerase chain reaction                         |
| <b>PM</b>      | proteína metabolizable                            |
| <b>qPCR</b>    | quantitative PCR                                  |
| <b>RDOM</b>    | rumen degradable organic matter                   |
| <b>rpm</b>     | revoluciones por minuto                           |
| <b>RFLP</b>    | restriction fragment length polymorphism          |
| <b>RUSITEC</b> | rumen simulation technique                        |
| <b>SAB</b>     | solid associated bacteria                         |
| <b>SEM</b>     | standard error of the mean                        |
| <b>SFCCF</b>   | single flow continuous culture fermenters         |
| <b>SIMPER</b>  | similarity percentage                             |
| <b>SPM</b>     | síntesis de proteína microbiana                   |
| <b>SSU</b>     | small subunit                                     |
| <b>TAE</b>     | tris ácido acético EDTA                           |
| <b>TE</b>      | tris cloro EDTA                                   |
| <b>TGGE</b>    | temperature gradient gel electrophoresis          |
| <b>TRF</b>     | terminal restriction fragment                     |
| <b>T-RFLP</b>  | terminal restriction fragment length polymorphism |
| <b>UE</b>      | unión europea                                     |
| <b>USP</b>     | united states pharmacopoeia                       |
| <b>UV</b>      | ultravioleta                                      |
| <b>UPGMA</b>   | unweighted pair group method with arithmetic mean |
| <b>VFA</b>     | volatil fatty acids                               |

## **CAPÍTULO 1**

### **Introducción y objetivos**

*Introduction and objectives*





### 1.1. Introducción / Introduction

El censo de ganado caprino en España ocupa el segundo lugar dentro de la UE-25 (MARM, 2007). La cabaña caprina se ha desarrollado tradicionalmente en zonas de climatología adversa, en las que este tipo de ganado constituía una forma rentable de aprovechamiento del medio, dada su capacidad para utilizar eficientemente pastos de baja calidad. Hasta hace una década la mayoría de las explotaciones caprinas españolas eran, fundamentalmente, de tipo mixto (El Aich *et al.*, 1995), con una alimentación basada en pastos naturales, y concentrados cuando el estado productivo de los animales así lo requería. Actualmente los sistemas de producción caprina en España son muy heterogéneos y tendentes a la intensificación, lo que cambia la relación, hasta ahora existente, entre el ganado caprino y el medio rural. La intensificación implica una mejora de las infraestructuras e instalaciones pero, también, una reducción del uso de alimentos autóctonos (Castel *et al.*, 2003), lo que diverge del modelo sostenible que propugna la Política Agraria Comunitaria. El uso generalizado de alimentos concentrados en los sistemas intensivos hace a este tipo de producción muy dependiente de las oscilaciones en el valor de los cereales. Por ello, en la última década ha cobrado un especial interés el estudio del efecto de la reducción de los alimentos concentrados en la dieta del ganado caprino sobre la fermentación ruminal y diferentes parámetros productivos (Dung *et al.*, 2005; Aregheore, 2006; Das y Ghosh, 2007).

En rumiantes el alimento experimenta una fermentación en el rumen que influye decisivamente en la utilización de los nutrientes que contiene. El estudio *in vivo* de la fermentación ruminal requiere disponer de animales canulados en el rumen y también, a veces, en distintos lugares del tracto digestivo posterior. El mantenimiento de animales fistulados tiene un elevado coste económico y de mano de obra. Por otro lado, la gran complejidad del ecosistema ruminal dificulta la realización de estudios *in vivo* bajo condiciones estrictamente controladas. Estos problemas, junto a consideraciones éticas y de bienestar animal han contribuido, en las últimas décadas, al desarrollo de sistemas *in vitro* que intentan simular la fermentación ruminal.

Los sistemas *in vitro* más simples consisten en tubos o botellas en los que se incuban muestras del alimento objeto de estudio con líquido ruminal, en

condiciones de anaerobiosis y a una temperatura de 39° C. Sin embargo, estos sistemas, que pueden ser herméticos o estar provistos de una válvula para la liberación de los gases de fermentación, presentan numerosos inconvenientes, por lo que únicamente se utilizan para incubaciones de corta duración y/o para determinar la producción de gas. Otros sistemas, más complicados, son los fermentadores, que incorporan algunas mejoras técnicas con respecto a los anteriores, para intentar simular mejor el proceso fermentativo que tiene lugar en el rumen. La variedad de fermentadores que se utilizan en la actualidad es amplia, pero básicamente pueden diferenciarse dos tipos: los sistemas de flujo continuo, de los que existen distintos modelos (Hoover *et al.*, 1976; Hannah *et al.*, 1986; Theather y Sauer, 1988; Fuchigami *et al.* 1989; Miettinen y Setälä, 1989; Meng *et al.*, 1999), y los sistemas de flujo semi-continuo, de los que el más conocido es el Rusitec (RUmen SIMulation TECnique; Czerkawski y Breckenridge, 1977). Con cualquiera de estos fermentadores pueden realizarse estudios de larga duración y, todos ellos, proporcionan una mejor simulación de la fermentación ruminal que los sistemas cerrados. Los diferentes tipos de fermentadores han sido, y son en la actualidad, muy utilizados en estudios referentes a diversos campos de interés en la nutrición de los rumiantes: análisis de las interacciones proteína:carbohidratos de la dieta (Mansfield *et al.*, 1994; Bach *et al.*, 1999); valoración nutritiva de alimentos (Calsamiglia *et al.*, 1996; Martín García, 2001; Moumen, 2003); efecto de aditivos (Carro *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2002) y efecto de distintas variables (Hoover *et al.*, 1984; Calsamiglia *et al.*, 2002), como el pH y ritmo de dilución, sobre la fermentación ruminal. Un aspecto al que se presta gran interés, en trabajos que utilizan fermentadores, es el que se refiere a la cuantificación de la síntesis de proteína microbiana y estudio de los factores que la afectan. La cuantificación *in vivo* de la proteína microbiana que se sintetiza en el rumen es compleja y costosa, por lo que los fermentadores representan una herramienta especialmente útil. El uso de fermentadores, en este aspecto, evita la utilización de marcadores de flujo, ya que el flujo de la digesta se determina directamente. Una ventaja adicional es que no existe la fracción de N endógeno que llega al duodeno de los animales, que complica la cuantificación de la síntesis microbiana *in vivo*. No obstante, los fermentadores también presentan inconvenientes. De hecho, factores como la absorción de los productos de fermentación a través de la

pared ruminal, el ritmo de tránsito de las fases sólida y líquida de la digesta en el animal, las fluctuaciones diurnas del pH ruminal, el mantenimiento de la población de protozoos e, incluso, la recogida de los gases producidos, resultan difíciles de simular.

Los inconvenientes mencionados previamente y otros problemas hacen que, en ocasiones, la fermentación ruminal producida en los fermentadores no sea similar a la que tiene lugar en el rumen de los animales. Por ello, el uso de sistemas *in vitro* debería estar supeditado a su previa validación, en distintas condiciones, mediante estudios comparativos directos entre la fermentación que tiene lugar en fermentadores y la que ocurre en el rumen de animales, alimentándose ambos con idénticas dietas. Existen algunos estudios comparativos directos, realizados con fermentadores de flujo continuo doble (Hannah *et al.*, 1986; Mansfield *et al.*, 1995), que simulan las tasas de dilución diferencial de sólidos y líquidos, o flujo continuo simple (Muetzel *et al.*, 2009), con una tasa de evacuación similar para ambas fracciones, y con ganado vacuno. Sin embargo, a pesar de que tales estudios comparativos se han realizado también con ganado ovino (Carro *et al.*, 2009) no se tiene conocimiento de que se haya llevado a cabo ninguno utilizando el ganado caprino como modelo de referencia. Dadas las discrepancias existentes, en cuanto a la fermentación ruminal, entre distintas especies de rumiantes (Prigge *et al.*, 1984; Reid *et al.*, 1990), así como en lo que se refiere a los resultados obtenidos con fermentadores de flujo continuo (Dahlberg *et al.*, 1988), doble o simple, parece lógico plantear la posibilidad de que los resultados obtenidos en las comparaciones directas referidas no sean aplicables a una situación en la que se utilicen fermentadores de flujo continuo simple como simuladores de la fermentación ruminal que tiene lugar en el ganado caprino. Por otro lado, los escasos trabajos que llevan a cabo comparaciones *in vivo* vs. *in vitro* apenas prestan atención al estudio de la microbiota que se establece en fermentadores, respecto de la del rumen. El uso de técnicas moleculares puede ser muy útil para caracterizar la composición, estructura y biomasa de las comunidades microbianas que constituyen la microbiota del rumen y de los fermentadores (Ziemer *et al.*, 2000).

Un aspecto de gran importancia en estudios con fermentadores, sobre el que no existe consenso, es el que se refiere a la cantidad de dieta que se

suministra a los fermentadores, tanto si se expresa en función del volumen efectivo de dichos fermentadores como en relación al volumen de saliva artificial infundido. Este aspecto influye directamente en los valores de pH alcanzados en el fermentador, cuyo efecto sobre la fermentación ruminal es de gran importancia (de Veth y Kolver, 2001; Calsamiglia *et al.*, 2002). No es de extrañar, por tanto, que muchos de los autores que han trabajado con estas metodologías hayan optado por fijar un valor constante del pH, para impedir que un bajo valor de éste parámetro pudiera interferir en la correcta simulación de la fermentación ruminal, ya que la capacidad tamponadora de los sistemas *in vitro* difiere de la que poseen los animales. Sin embargo, si se analizan dietas de distinta calidad, fundamentalmente con diferentes relaciones forraje – concentrado, se han de mantener valores de pH distintos, a semejanza de lo que ocurre *in vivo*. Recientemente se ha comprobado que aunque las características de la dieta son determinantes para algunos parámetros de la fermentación ruminal, independientemente del pH que se alcance, el valor (Calsamiglia *et al.*, 2008) y las fluctuaciones (Wales *et al.*, 2004; Cerrato-Sánchez *et al.*, 2007a) de este siguen siendo aspectos críticos para otros muchos parámetros de la fermentación.

---

*Spain has the second largest goat's livestock number in the UE-25 (MARM, 2007). Goat production has been developed mainly in areas with severe weather, in which this type of livestock represents a sustainable and profitable way of making a good use of the land, due to their ability to use low quality pasture. Until very recently, Spanish goats farms were based on mixed production systems (El Aich *et al.*, 1995), which means that natural pastures were supplemented with concentrates according to the physiological state of the animals and the season. Currently, the systems cover a wide range but tend to the intensification, which is changing the relationship between livestock and the rural environment. Intensification involves an improvement of facilities, but also a reduction of the use of local resources (Castel *et al.*, 2003), which sometimes disagrees with the sustainable model proposed by the Common Agricultural Policy within the European Union. The use of concentrate feeds in the intensive production systems makes them very much dependent on the changes in*

cereals prices. Thus, in the last decade there has been an increasing interest of the study of effects of reducing the use of concentrates in goat's diets on rumen fermentation and on different production parameters (Dung et al., 2005; Aregheore, 2006; Das y Ghosh, 2007).

*In ruminants, the feedstuffs are subjected to fermentation in the rumen which mainly determine to what extent nutrients are utilized. The study of the rumen fermentation in vivo requires the use of cannulated animals and this is expensive and time consuming. The complexity of the rumen environment makes difficult its study under controlled conditions. These mentioned problems plus high animal variability, ethic and welfare public concerns have contributed to the development of in vitro systems to simulate the rumen fermentation.*

*The simplest in vitro systems consist of tubes or bottles in which the feed is incubated with rumen liquid in anaerobic conditions at 39°C. However, these systems (that can be either tight closed or allow the release of fermentation gases) have some limitations, so they are only used for short term incubations to measure gas production. Other more complicated systems, so called fermenters, have technical advantages. There is a wide range of different type of fermenters used to simulate the rumen activity. There are two main categories: those with continuous flow (including different models: Hoover et al., 1976; Hannah et al., 1986; Theather y Sauer, 1988; Fuchigami et al. 1989; Miettinen y Setälä, 1989; Meng et al., 1999) and those with semi continuous flow, being the best known the Rusitec (RUmen Stimulation TECnique; Czerkawski y Breckenridge, 1977).*

*With any of these fermenters, long term incubation trials can be carried out, providing a more realistic simulation. The different type of fermenters have been used in different aspects of interest in animal nutrition: interactions protein- carbohydrates (Mansfield et al., 1994; Bach et al., 1999); effects of additives (Mansfield et al., 1994; Bach et al., 1999) and of different variables such as pH or dilution rate (Hoover et al., 1984; Carro et al., 1995; Calsamiglia et al., 2003). Among the studied parameters there is one of high importance in ruminant nutrition: the estimation of the microbial protein synthesis in the rumen. The quantification of this parameter in vivo is difficult and expensive and the in vitro approaches represent a technical advantage as the use of flow markers is avoided. In addition, the complication associated to the endogenous*

*fraction is also avoided by using fermenters. Nevertheless, the use of fermenters has disadvantages too. In fact, the simulation of variables such as solid and liquid flow rates, changes in pH, maintenance of protozoa and the collection of fermentation gases are difficult to simulate.*

*These disadvantages and other problems make the simulation achieved by fermenters to be very poor in comparison to what happens in the rumen. This is the reason why a good validation is essential, assessing the simulation ability in comparative studies (rumen vs. fermenters) in different feeding regimes. There are some studies comparing the cows rumen and dual flow continuous culture fermenters (Hannah et al., 1986; Mansfield et al., 1995) that simulate the differential dilution rate of solid and liquid fractions, or single flow continuous culture fermenters (Muetzel et al., 2009) with a similar fate for both fractions. However, despite that there is one study comparing fermenters and the sheep rumen (Carro et al., 2009), there are no works in the literature using the goats rumen as reference. Given the differences and peculiarities reported between animal species (Prigge et al., 1984; Reid et al., 1990) with regards to the rumen fermentation and the results obtained with single and dual flow fermenters (Dahlberg et al., 1988) it appears necessary to validate the simulation achieved by single flow continuous culture fermenters in comparison with the goats rumen. This would show the potential of this approach to study the goat's rumen metabolism in vitro. On the other hand, the few in vitro vs. in vivo studies reported in the literature, do not pay attention on the microbial groups that are maintained in vitro compared to that in the rumen. The use of molecular techniques to study the different microbial groups in complex ecosystems such as the rumen has been shown to be an useful tool (Ziemer et al., 2000).*

*There is also one point in relation to the use of fermenters that still remains inconclusive which is the amount of diet provided to the fermenter, either expressed in relation to the culture volume or the amount of saliva infused daily. This has a significant impact on pH and therefore on the fermentation (de Veth y Kolver, 2001; Calsamiglia et al., 2002). It is not surprising that some authors opted to use a fixed value of pH to avoid too low pH values with the impact that would have on the fermentation. However, when assessing different quality diets (mainly using different forage to concentrate ratios) the proper simulation*

*of the fluctuations in pH, as occurs in vivo, is critical (Wales et al., 2004; Cerrato-Sánchez et al., 2007) due to its effect on other parameters.*

## **1.2. Objetivos / Objectives**

a) Evaluar el potencial que los fermentadores de flujo continuo simple tienen para simular la fermentación ruminal del ganado caprino alimentado con dietas prácticas de calidad variable.

b) Analizar los efectos de la sustitución parcial de concentrado en la dieta sobre la fermentación ruminal, en ganado caprino y en fermentadores de flujo simple continuo

c) Analizar y comparar las comunidades bacterianas presentes en el ecosistema ruminal del ganado caprino y en los fermentadores de flujo continuo simple, con dietas de distinta calidad.

---

*a) To evaluate the potential of single-flow continuous-culture fermenters to simulate rumen fermentation in goats fed with diets differing in their quality.*

*b) To analyse the effects of replacing part of the concentrate in the diet on goats rumen fermentation and in single flow continuous culture fermenters.*

*c) To analyse and compare the bacterial communities present in the goats rumen ecosystem and in single flow continuous culture fermenters both fed different quality diets.*





## **CAPÍTULO 2**

### **Revisión Bibliográfica**



## **2.1. El sector caprino y su alimentación**

El ganado caprino es una de las especies ganaderas de mayor relevancia en el ámbito rural. Tradicionalmente se ha desarrollado en zonas caracterizadas por largos períodos de sequía, y por tanto, de escasez de pasto, en las que este tipo de ganado constituye una forma de aprovechamiento rentable del medio, gracias a ciertas peculiaridades fisiológicas y de conducta que lo diferencian de otras especies de rumiantes. Además, desde un punto de vista socioeconómico, el manejo tradicional de la cabaña caprina ha conllevado la presencia del hombre en zonas rurales deprimidas, lo que, por un lado, aseguraba el mantenimiento de unas condiciones agroambientales adecuadas del entorno y, por otro, evitaba la despoblación en zonas deprimidas. Sin embargo, el análisis de la evolución experimentada en los últimos años muestra un sector muy heterogéneo, en constante evolución y en un proceso acelerado de intensificación, lo cual cambia la relación hasta ahora existente entre el ganado caprino y el medio rural. Este cambio ha sido provocado, en parte, por la dinámica de las explotaciones y, en parte también, por la incidencia de factores externos como la globalización de los mercados y el aumento de la demanda de productos por parte de los consumidores, que solicitan alimentos cada vez de mayor calidad. En este sentido, la leche de cabra se ha creado un nicho de mercado muy concreto por sus propiedades químicas y organolépticas, estando especialmente indicada en niños convalecientes y personas alérgicas a otras leches, dada su mejor digestión (Haenlein, 2001).

### **2.1.1. Censo y producciones**

Según los últimos datos proporcionados por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM, 2007) el censo caprino en España lo componen 2.892.000 de cabezas, con una reducción del 2,2% con respecto al año 2006. Esta reducción es poco destacable dadas las marcadas oscilaciones anuales que la cabaña caprina ha experimentado en la última década como consecuencia, fundamentalmente, de la inestabilidad de los precios de la leche, principal producto del caprino. En la **tabla 2.1** se puede observar que un 39,1% del censo de caprino se concentra en Andalucía, que ocupa la primera posición

en España. Por otra parte, el 79,7 % del censo nacional está localizado en las comunidades autónomas más meridionales (Andalucía, Canarias, Extremadura, Castilla-La Mancha y Murcia, por orden de posición en el censo), lo que pone de manifiesto una marcada distribución territorial, en zonas con menores recursos forrajeros.

**Tabla 2.1.** Análisis autonómico del censo caprino 2006-07 (MARM, 2007)

| COMUNIDAD AUTÓNOMA     | CENSO<br>(en miles de cabezas) |              | % sobre total<br>nacional |
|------------------------|--------------------------------|--------------|---------------------------|
|                        | 2006                           | 2007         |                           |
| Galicia                | 76                             | 53           | 1,8                       |
| Principado De Asturias | 29                             | 27           | 0,9                       |
| Cantabria              | 17                             | 24           | 0,8                       |
| País Vasco             | 27                             | 28           | 1,0                       |
| Navarra                | 10                             | 12           | 0,4                       |
| La Rioja               | 30                             | 9            | 0,3                       |
| Aragón                 | 49                             | 58           | 2,0                       |
| Cataluña               | 91                             | 82           | 2,8                       |
| Baleares               | 11                             | 25           | 0,9                       |
| Castilla –León         | 133                            | 167          | 5,8                       |
| Madrid                 | 24                             | 16           | 0,6                       |
| Castilla – La Mancha   | 405                            | 315          | 10,9                      |
| Comunidad Valenciana   | 89                             | 86           | 3,0                       |
| Murcia                 | 118                            | 201          | 7,0                       |
| Extremadura            | 296                            | 293          | 10,1                      |
| Andalucía              | 1107                           | 1132         | 39,1                      |
| Canarias               | 393                            | 363          | 12,6                      |
| <b>TOTAL</b>           | <b>2.905</b>                   | <b>2.892</b> | <b>100,0</b>              |

España ocupaba en 2007 el segundo lugar en el censo caprino europeo (12,8 millones de cabezas) con el 21,6 % de cabezas, precedido por Grecia (37,2%) y, por delante de Francia (9,4%). Estos tres países junto a Italia (6,9%) representan el 75,1% del total poniendo de relieve una localización marcadamente mediterránea. El panorama mundial es también revelador, encontrándose un 96% del censo caprino (746 millones de cabezas, FAOSTAT 2005) en países subdesarrollados y en vías de desarrollo (Rumosa-Gwaze *et al.*, 2008), lo que confirma el importante papel que sigue jugando la especie caprina en las economías de subsistencia, en el aprovechamiento de áreas marginales de escasos recursos forrajeros y, en la transformación de subproductos agrícolas. Durante el período 1978-1998 el censo mundial de cabras ha experimentado un incremento del 52% en paralelo a un aumento del 33% en la población humana (FAO, 1999). En el mismo periodo los censos de vacuno y ovino han experimentado cambios del 8% y -3%, respectivamente.

En el contexto europeo el número de cabezas de caprino ha descendido en los últimos 20 años y en España se ha mantenido, aunque con las mencionadas oscilaciones. En algunas regiones, como Andalucía, incluso ha aumentado hasta un 20%. En 2005, en España se produjeron 483 millones de litros de leche de cabra, lo que supone casi el 30% de la producción de la UE-15, ocupando el tercer puesto, tras Francia y Grecia (FAOSTAT, 2005). En el año 2003, Andalucía fue la región con mayor producción de leche de cabra, con casi el 50% del total español, seguida por Canarias y Castilla-La Mancha. La cantidad de leche de cabra producida en España ha ido aumentando; mientras que en 1991 la producción rondaba los 290 millones de litros, en el año 2005 se situaba cerca de los 485 millones, lo que supone un aumento de casi 200 millones de litros (FAOSTAT, 2005).

### **2.1.2. Estado actual y evolución previsible de la producción caprina**

Los sistemas españoles de producción caprina han sido caracterizados por diversos autores (García, 1999; ADR Nororma, 2001; Mena *et al.*, 2005). Estos trabajos muestran la gran diversidad de explotaciones que existe en nuestro territorio, aunque con aspectos comunes, como el carácter familiar de las mismas, la falta de gestión técnico-económica y la falta de vertebración del sector. En cuanto a la base animal, predominan las razas con una alta especialización lechera, como es el caso de las murciano-granadina, malagueña, florida y majorera, y otras que, habiendo tenido una aptitud tradicionalmente mixta (leche – carne), se están especializando en la producción de leche, como es el caso de las razas payoya, verata y palmera. Las razas de orientación cárnica, como la blanca serrana, representan un porcentaje pequeño del caprino español, siendo habitual encontrar las explotaciones de esta raza en combinación con otra actividad (agraria o no). Además de en la genética animal existe gran heterogeneidad en otras características de los sistemas de explotación, como el manejo de la alimentación y el grado de tecnificación y, todo ello, determina el tipo de sistema de producción. Así, se pueden encontrar sistemas intensivos, en los que los animales permanecen estabulados y cuya alimentación depende del exterior. En los sistemas semi - intensivos y semi - extensivos las cabras

aprovechan los recursos pastables que el medio les ofrece y reciben concentrados en los periodos de mayor producción lechera y de escasez de pastos. Además, existe una amplia gama de sistemas que combinan características de los descritos previamente. Los sistemas extensivos propiamente dichos, que quedan relegados a explotaciones de sierra con razas cárnicas, son cada vez más escasos. A pesar del proceso de intensificación, la producción de leche sigue siendo estacional, con una producción máxima en primavera y mínima al final del verano e inicio del otoño, al contrario de lo que ocurre con sus precios.

La ganadería caprina ha estado ligada tradicionalmente a zonas rurales, poco productivas desde el punto de vista agrícola, dado que las cabras tienen una gran capacidad para el aprovechamiento de los pastos de escasa calidad. Esta localización ha hecho que el ganado caprino juegue un importante papel en el mantenimiento de zonas marginales y de la población asociada a ellas. Actualmente, en España, el 86% de las cabras se encuentran en las áreas menos favorecidas (de Rancourt *et al.*, 2006), aunque los sistemas de explotación han cambiado sustancialmente y evolucionado, en la última década, de forma muy rápida, hacia la producción láctea profesionalizada que representa el 73,5% de los rebaños de cabras (de Rancourt *et al.*, 2006). Según Oregui y Falagán (2006), en los últimos años se ha producido un aumento en el número de animales por rebaño, aunque ha disminuido el número de explotaciones. Esta especialización se ha acompañado de una intensificación del sistema productivo, con hechos tales como la introducción de razas foráneas (saanen y alpina) o la sustitución de los rebaños de razas de aptitud cárnica (blanca serrana) por razas lecheras (granadina, malagueña, florida). Esta tendencia a la intensificación no es exclusiva de nuestro país, ya que también ocurrió en Francia hace décadas, y está teniendo lugar en otros países de la Cuenca Mediterránea, como Grecia e Italia.

Los factores que han determinado la especialización e intensificación son múltiples y, entre ellos, cabe destacar los siguientes:

- 1)** El caprino ha dejado de ser una actividad marginal debido al incremento de la demanda de esta especie, lo que durante unos años ha propiciado unos precios altos. En consecuencia la producción caprina se ha convertido en una

actividad económicamente viable con producciones crecientes a base de animales seleccionados genéticamente o de estrategias alimentarias y reproductivas. El incremento en la demanda de leche está relacionado, en parte, con un aumento en el consumo de queso, que en nuestro país ha pasado de 5,7 kilos por persona y año en 1994 a 11 kilos en 2004; es previsible que el consumo se incremente hasta llegar a la media (17 kilos) de la UE (Sánchez Rodríguez *et al.*, 2002).

**2)** La falta de mano de obra especializada, mucho más acentuada en zonas marginales, así como la exigencia, por parte del ganadero, de mejores condiciones de trabajo y nivel de vida.

**3)** El elevado precio de la tierra, que sólo permite la compra por parte del ganadero que se inicia en la actividad, de la superficie necesaria para las instalaciones y parques de ejercicio.

**4)** La demanda, por parte de las grandes industrias lácteas, de una producción constante de leche a lo largo del año, que ha modificado el sistema de manejo.

**5)** La necesidad de adaptación a la normativa europea para mejorar la calidad de la leche y el estado sanitario de los animales, todo ello encaminado hacia la seguridad alimentaria.

**6)** El apoyo de la administración para la mejora de las instalaciones y de la calidad de la leche y la aplicación de nuevas tecnologías (salas de ordeño mecánicas, tanque de frío, lactancia artificial, etc.).

Si se observa lo que está ocurriendo en el sector y lo que propugnan, teóricamente, las políticas agroalimentarias y agroambientales, parece existir una contradicción: por un lado, las circunstancias comentadas anteriormente están conduciendo al sector a una rápida intensificación, desligándolo de su medio natural y, por otro lado, la PAC incentiva y fomenta el desarrollo de sistemas productivos más sostenibles y ligados al medio natural. Una de las



principales fortalezas del sector es que aún se mantiene, en una proporción importante, ligado a zonas marginales, utilizando razas autóctonas y pastos naturales, lo que redundará en un aprovechamiento y una revalorización de dichas zonas, además de generar productos de gran calidad. Ello puede ser positivo de cara a las políticas agrarias, que tratan de convertir al ganadero en gestor del medio ambiente. La labor medioambiental y social de este tipo de ganadería está recogida en la filosofía y principios generales de la PAC. Se trata, como se ha comentado anteriormente, de un sector en el que predomina la mano de obra familiar, que contribuye a la fijación de la población en zonas rurales marginales, con escasos recursos económicos e impide que las empresas transnacionales ejerzan el monopolio de la producción, como ha ocurrido en otros sectores ganaderos (porcino, avícola). En los últimos años, el ganadero ha mejorado su formación tanto técnica como empresarial, y se han mejorado las infraestructuras e instalaciones, sobre todo las relacionadas con el ordeño (ya casi todo mecanizado) y la conservación de la leche hasta su venta. Se trata, sin duda, de un sector que debe reforzarse dado su carácter estratégico como la alternativa más sostenible económica y socialmente para los territorios rurales.

### **2.1.3. Alimentación del ganado caprino**

El binomio, objetivo productivo-estrategias de alimentación, es el elemento definitorio y más usado para tratar de clasificar la enorme casuística de sistemas de producción caprina en España (Vacas-Fernández, 2003). En un extremo se sitúan los rebaños de producción cárnica, con niveles bajos de productividad, cuya alimentación se hace exclusivamente con recursos procedentes del pastoreo. En otro extremo se encuentran los rebaños de especialización lechera, altamente productivos, en los que la suplementación es importante e, incluso, imprescindible en los casos de estabulación permanente. En general, en todos los sistemas productivos el suplemento es necesario para incrementar la productividad (Narjissé *et al.*, 1991). La mayoría de las explotaciones caprinas españolas son de tipo mixto (El Aich *et al.*, 1995), con alimentación basada en pastos naturales y en concentrado, cuando la producción de leche lo requiere. Castel *et al.* (2003) destacan el proceso de intensificación inevitable al que se aboca la producción caprina en España, con

una mejora de las infraestructuras e instalaciones, pero también con la reducción en el uso de fuentes de alimentación naturales. En este aspecto, es importante destacar la gran dependencia exterior que tienen los sistemas intensivos, en estabulación, y los semi-intensivos, que emplean una gran cantidad de concentrados, lo que los hace muy vulnerables a los cambios en los precios de las materias primas, especialmente del precio del petróleo. En un estudio (García Trujillo, 2004), en el que se evalúa el grado de sostenibilidad de diferentes explotaciones caprinas, se observó que un sistema semi-extensivo depende de recursos no renovables en un 40%, mientras que en el intensivo el porcentaje es del 89% y en el semi-intensivo del 53%. Castel *et al.* (2003) proponen frenar la intensificación mediante el desarrollo de la producción caprina en áreas con fuentes forrajeras apropiadas. Para ello, se hace necesario evaluar forrajes naturales y subproductos agrícolas locales como alimentos para el ganado, que permitan el desarrollo de ese modelo.

#### **2.1.3.1. Efectos de la utilización de concentrados en la alimentación del ganado caprino**

El suministro de energía representa, generalmente, el componente más costoso de una dieta y el principal factor limitante de la producción animal. En España el uso de concentrados en la alimentación caprina es una práctica cada vez más extendida, tanto en sistemas intensivos como semi-intensivos, y ha sido considerado excesivo en los sistemas andaluces (Mena-Guerrero *et al.*, 2005). El objetivo de su empleo es incrementar la ingesta y digestibilidad de la dieta (INRA, 1988), conceptos muy relacionados entre sí (Dixon y Stockdale, 1999). Mediante el uso de concentrados se consigue incrementar el aporte neto de nutrientes, fundamentalmente energía y proteína, en aquellos períodos en que los recursos forrajeros no alcanzan a cubrir las necesidades específicas del ganado, permitiendo unos rendimientos cercanos a su potencial productivo. Los concentrados están, en general, compuestos de material molido finamente dividido, rico en contenidos celulares y con baja proporción de la fracción menos digestible de las paredes celulares (INRA, 1988). Estas características físico-químicas de los concentrados conllevan, por un lado, una disminución del tiempo de masticación y rumia del ganado (Santini *et al.*, 1992) y, por otro lado,

una rápida colonización y fermentación por la microbiota del rumen. La ingestión, degradación y velocidad de paso de los concentrados es, en general, más rápida que la de los forrajes (Bargo *et al.*, 2002), lo que teóricamente permite aportar una mayor cantidad de nutrientes en un menor volumen, que corresponde a un mayor contenido en energía neta por kg de materia seca (INRA, 1988) y también, aunque no necesariamente, de un mayor contenido en N. El contenido en fracciones fibrosas, especialmente el de la LAD de un alimento permite predecir su digestibilidad (Giger-Reverdin *et al.*, 1994). El bajo contenido de estas fracciones en los concentrados, especialmente los basados en cereales (Dijkstra, 1994; Bannink *et al.*, 2006) determina su elevada digestibilidad. Un rápido acceso de los microorganismos del rumen a sustratos fácilmente fermentables promueve un aumento en la producción de ácidos grasos volátiles y de proteína microbiana, lo que se traduce en un mayor aporte de energía metabolizable (EM) y de proteína metabolizable (PM) o digestible en el intestino (PDI). Por el contrario, la rápida ingestión de los concentrados y el menor tiempo de rumia que requieren determinan una menor producción de saliva, lo que unido a su extensa fermentación en el rumen da lugar a una disminución del pH, tanto más acusada cuanto mayor sea la proporción de concentrado en la dieta y cuanto mayor sea la proporción de carbohidratos solubles, fácilmente fermentables, en dicho concentrado. Los efectos de la disminución del pH en el rumen son bien conocidos; su consecuencia más inmediata es la disminución de la actividad celulolítica de los microorganismos (Mould *et al.*, 1983; Mould y Ørskov, 1983; Hoover, 1986; Russell y Wilson, 1996) y, en consecuencia, de la digestión de la fibra (Ørskov y Fraser, 1975; Mould *et al.*, 1983; Ørskov, 1999). Además, cuando el pH desciende por debajo de ciertos valores no solo se modifica el metabolismo ruminal, disminuyendo la eficiencia de utilización de los nutrientes de las dietas, sino que, a largo plazo, puede ocasionar serios problemas de salud al rumiante (cetosis, laminitis, infertilidad, etc.). Parece, pues, que en cada momento de producción ha de existir un equilibrio entre los beneficios potenciales del uso de concentrados y las desventajas de un aporte excesivo. Dicho equilibrio depende del tipo de forraje y de la cantidad y calidad del concentrado adicionado.

Los alimentos concentrados que aportan energía son de distinta naturaleza (Dulphy *et al.*, 1982) pero pueden distinguirse, fundamentalmente,

concentrados con bajo contenido en fibra y alto en almidón y aquellos en los que el contenido en fibra digestible es elevado y presentan una degradación más lenta y sostenida (Giger, 1987). Cuando se adicionan alimentos concentrados a las dietas de pequeños rumiantes se pueden diferenciar tres situaciones (Dove, 2002):

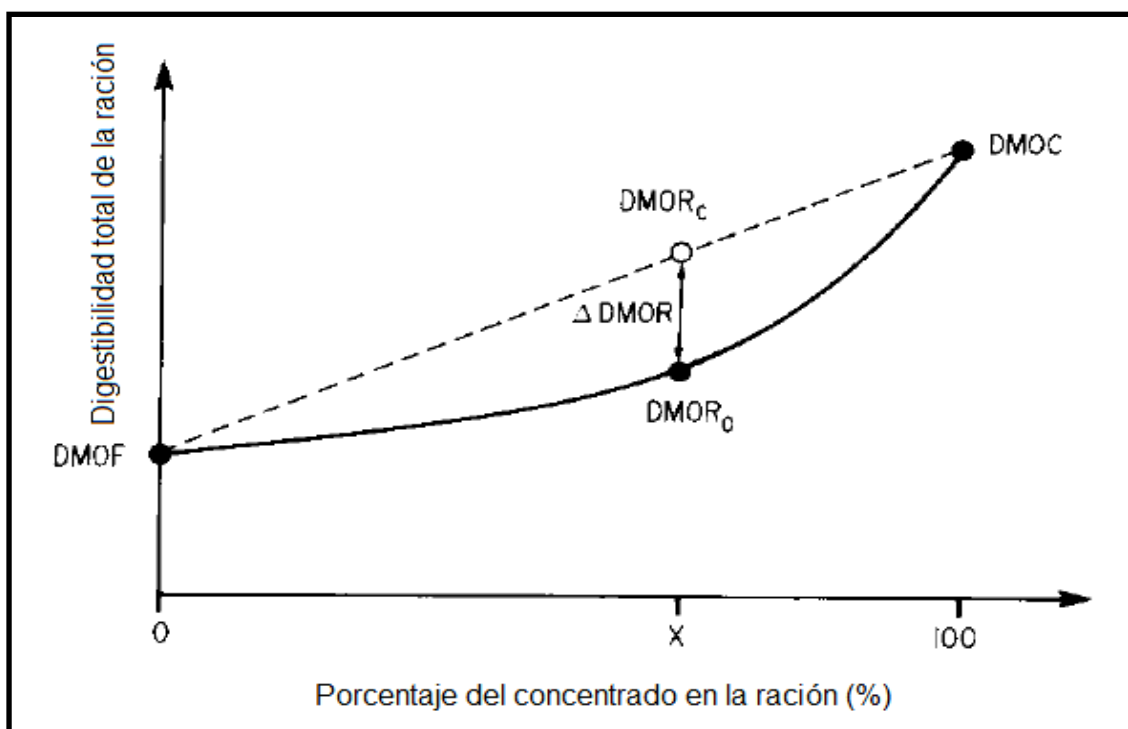
- Suplementación: El concentrado se adiciona con el objetivo de aportar nutrientes extra, sin disminuir la ingesta del forraje base. Este es el objetivo perseguido por la mayoría de ganaderos, pero el más difícil de alcanzar.
- Sustitución: El concentrado suministrado reduce la ingesta de forraje. Es la situación más común en animales en pastoreo.
- Complementación: El concentrado que se aporta aumenta el consumo del pasto o forraje. Esta situación suele ocurrir cuando el concentrado aporta un nutriente limitante, en una dieta basada en un forraje de mala calidad.

En general los alimentos concentrados se suministran bien para aportar nutrientes deficientes en la dieta base, o bien para incrementar el suministro de nutrientes totales, mediante un aumento de la digestibilidad e ingestión de la dieta, y así aumentar la producción animal. En este contexto, el aporte total de nutrientes puede referirse a las ingestas de energía metabolizable (EM), proteína metabolizable (PM) o a ambas. La PM puede obtenerse mediante el aumento de la síntesis de proteína microbiana en el rumen, el aporte de proteína dietética no degradable en el rumen (PNDR) o utilizando ambas estrategias.

La adición de concentrados a rumiantes modifica la cantidad de forraje ingerido (Moorby *et al.*, 2006) y la digestibilidad de la dieta (Madrid *et al.*, 1997), siendo estos efectos o interacciones (Berge y Dulphy, 1991) menos importantes en mantenimiento que en producción (Wainman *et al.*, 1981). Las interacciones forraje-concentrado determinan que la digestibilidad total de una ración sea diferente a la calculada como suma ponderada de las digestibilidades del forraje y del concentrado (INRA, 1978). Con concentrados

ricos en almidón o azúcares suelen producirse interacciones negativas, es decir, que la digestibilidad de la dieta es inferior a la suma de las de sus componentes. Por el contrario, los concentrados ricos en fibra digestible y pectinas determinan, generalmente, interacciones positivas (digestibilidad de la dieta superior a la suma de las de sus componentes). Dado que la ingesta está correlacionada con la digestibilidad, como han observado diversos autores en caprino (Ben Salem *et al.*, 2003; Salem *et al.*, 2006) y ovino (Liu *et al.*, 2005), las interacciones positivas o negativas que afectan a la digestibilidad suelen extenderse también a la ingesta. Los principales factores que determinan estas interacciones son:

- La proporción del concentrado en la ración (Dulphy *et al.*, 1983; Guérin y Dulphy, 1984; Favardin *et al.*, 1991; NRC, 2001), que es uno de los factores más determinantes en la interacción digestiva y cuyo mecanismo simplificado se muestra en la **Figura 2.1**.



**Figura 2.1.** Consecuencias de las interacciones digestivas sobre la estimación de la digestibilidad total de raciones mixtas.  $DMOR_0$  = digestibilidad observada de la MO de la ración;  $DMOR_c$  = digestibilidad calculada de la MO de la ración;  $DMOF$  = digestibilidad de la MO del forraje;  $DMOC$  = digestibilidad de la MO del concentrado;  $\Delta DMOR$  = interacción digestiva (Berge y Dulphy, 1991)

- La naturaleza del forraje: las interacciones digestivas negativas aumentan con el contenido en fibra del forraje (INRA, 1978) siendo notables en el caso de las pajas (Dulphy *et al.*, 1983). Más rigurosamente, la interacción es positiva con cantidades pequeñas de concentrado y pasa a ser negativa cuando el pH ruminal desciende conforme aumenta el aporte de concentrado.
- La naturaleza del concentrado (Ørskov, 1999): las interacciones digestivas negativas son más importantes con concentrados basados en granos de cereales, en comparación con los concentrados menos ricos en almidón como los que incluyen en pulpa de remolacha o salvado de trigo (Vérité y Dulphy, 1981). Además, estas interacciones son menos acusadas en el caso de concentrados que aporten N a una ración deficiente (Dulphy *et al.*, 1982; Guérin y Dulphy, 1984).
- El nivel de alimentación de los animales (Edionwe y Owen, 1989).

El hecho de que la interacción entre la digestibilidad del forraje y la del concentrado dependa de numerosos factores y que el término concentrado englobe a alimentos de naturaleza muy diversa, podría explicar las controversias encontradas en la bibliografía respecto a la idoneidad de aumentar el concentrado en las dietas de rumiantes por encima de ciertos niveles. Varios autores han encontrado respuestas positivas a la adición de concentrados, por encima de cierto porcentaje, en la digestibilidad y/o ingesta de MS (Kawas *et al.*, 1991; Andersen *et al.*, 2003; Moorby *et al.*, 2006; Tripathi *et al.*, 2007; Tufarelli *et al.*, 2009; Owens *et al.*, 2008), la síntesis de proteína microbiana (Moorby *et al.*, 2006; Owens *et al.*, 2008), la producción de leche, la eficiencia de utilización de los alimentos y ganancia de peso (Khalili y Sairanen, 2000; Yang *et al.*, 2001; Andersen *et al.*, 2003; Andrade y Schmidely, 2006; Moorby *et al.*, 2006; Tripathi *et al.*, 2007; Tufarelli *et al.*, 2009). Otros autores no han observado incrementos en alguno o varios de estos parámetros (Faverdin *et al.*, 1991; Kawas *et al.*, 1991; Richards *et al.*, 1994; Andrade *et al.*, 1996; Liu

*et al.*, 2005; Andrade y Schmidely, 2006; Lascano y Heinrichs, 2009). En algunos trabajos se ha constatado que la adición de concentrados a la dieta tiene efectos positivos hasta alcanzar un determinado nivel a partir del cual no existe efecto o este es negativo (Chandramoni *et al.*, 2000; Goetsch *et al.*, 2001; Dung *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Lefrileux *et al.*, 2008).

### **2.1.3.2. Estrategias para reducir el consumo de cereales en la alimentación del ganado caprino**

Los sistemas de producción caprina suelen desarrollarse, como se ha puesto de manifiesto, en países de climatología adversa en los que la escasez de agua repercute negativamente en la producción agrícola y la disponibilidad de pastos. Es por ello que la producción caprina semi-intensiva requiere la importación de alimentos concentrados, en aquellos meses en que los recursos naturales no son suficientes para cubrir las necesidades energéticas que requiere la producción. Muchos autores han desarrollado estrategias de alimentación en los pequeños rumiantes con objeto de incorporar a sus dietas alimentos autóctonos, de bajo coste que sustituyan parcialmente los alimentos concentrados comerciales, cuyos precios se han disparado hasta niveles record en los últimos años (FAO, 2006), sin mermar la capacidad productiva de los animales (Das y Ghosh, 2007). Algunos estudios han demostrado que la utilización de arbustos, leguminosas, o subproductos agroindustriales pueden utilizarse con éxito como suplementos en dietas para pequeños rumiantes, sin comprometer el rendimiento productivo. Sin embargo, su inclusión en dietas de animales lecheros debe controlarse debido a su valor nutritivo bajo-medio y a los altos requerimientos nutritivos de animales de alta producción (Vasta *et al.*, 2008). En otros casos la cantidad de concentrado se ha reducido en las dietas para caprino en lactación mediante el aporte de forrajes de buena calidad (Goetsch *et al.*, 2001), hojas de leguminosas (Richards *et al.*, 1994) e, incluso, disminuciones de los concentrados en función de la disponibilidad de forrajes naturales (Morales *et al.*, 2000), sin apreciar cambios aparentes en su producción. Recientemente, el uso de subproductos agroindustriales en la nutrición de rumiantes se ha realizado con éxito como estrategia para reducir los costes de la alimentación, sin repercutir en el rendimiento (Morales *et al.*, 2000; Malau-Aduli *et al.*, 2003). Así, se utilizan la pulpa de cítricos (Bueno *et*

*al.*, 2002), productos derivados de la industria oleica (Ben Salem *et al.*, 2003; Yañez *et al.*, 2004a y b; Ben Salem y Znaidi, 2008), subproductos del algodón (Belewu y Ademilola, 2002), pulpa de remolacha (Olfaz *et al.*, 2005), de manzana (Pirmohammadi *et al.*, 2006) o de tomate (Ben Salem y Znaidi, 2008). Otros autores han puesto de manifiesto las ventajas que conlleva la fabricación local de alimentos concentrados con recursos autóctonos cuya utilización no disminuye significativamente la producción de los pequeños rumiantes (Mahgoub *et al.*, 2005; Aregheore *et al.*, 2006). Otros, sin embargo, han observado una disminución de la productividad (Mahgoub *et al.*, 2007). Vasta *et al.* (2008), en su revisión, concluyen que es posible mantener la productividad de pequeños rumiantes y la calidad de sus productos con dietas basadas en fuentes alternativas de alimento, pero que se debe prestar especial atención tanto a la formulación de las dietas que incluyan estos subproductos, de moderado valor nutritivo, como a la posible presencia de factores anti-nutricionales como los taninos.

### **2.1.3.3. Peculiaridades fisiológicas y de comportamiento alimenticio del ganado caprino frente a otros rumiantes**

Uno de los atributos mejor conocidos del ganado caprino es su capacidad para desarrollarse en ambientes de clima adverso, que dificultaría el asentamiento de otros rumiantes como ovino y vacuno (Lu, 1989; Narjissé, 1991). Ello confiere al caprino un importante papel en áreas templadas (Morand-Fehr y Sauvart, 1978), en los trópicos (Devendra, 1980) y en áreas semiáridas (Hadjipanayiotou, 1987). Esta capacidad de adaptación del ganado caprino a zonas pobres en recursos forrajeros, en comparación con otros rumiantes, se ha tratado de explicar en base, entre otros factores, a una eficiencia digestiva superior. Esta mayor capacidad digestiva del caprino frente a ovino y bovino ha sido observada por numerosos autores (Devendra y Burns, 1983; Alrahmoun *et al.*, 1986; Trung y Devendra, 1987; Morand-Fehr, 1989; Domingue *et al.*, 1991; Lindberg y Gonda, 1997; Salem *et al.*, 2006) especialmente cuando son alimentados con dietas de baja calidad (Howe *et al.*, 1988; García *et al.*, 1995; AFRC, 1998). También se ha observado una mayor utilización del N en caprino frente a ovino con dietas pobres en proteína



(Lindberg y Gonda, 1997; Molina-Alcaide y Yáñez-Ruiz, 2008; El-Meccawi *et al.*, 2009). La mayor capacidad digestiva del caprino se ha asociado a factores como una masticación más prolongada y eficaz, especialmente importante con dietas de baja calidad (Focant *et al.*, 1986; Domingue *et al.*, 1991; Hadjigeorgiou *et al.*, 2003), un comportamiento selectivo que les permite ingerir las partes de las plantas con mayor valor nutritivo y menor contenido en compuestos no nutritivos (van Soest, 1982; Bato y Sevilla, 1988; Morand-Fehr *et al.*, 1991; Ben Salem *et al.*, 2003), un mayor tiempo de retención de los alimentos en el rumen (Domingue *et al.*, 1991), una mayor síntesis de proteína microbiana en el rumen (Hadjipanayiotou y Antoniou, 1983), un mayor número de microorganismos celulolíticos (Tisserand *et al.*, 1986), una mayor tolerancia a la presencia de altas cantidades de taninos u otros compuestos secundarios (Silanikove *et al.*, 1996; Yáñez-Ruiz y Molina-Alcaide, 2007), debida a la presencia en el rumen de caprino de bacterias ruminales degradadoras de taninos como *Streptococcus caprinus* (Brooker *et al.*, 1994); un mayor reciclado de la urea sanguínea hacia el rumen (Narjissé y Malechek, 1990), etc. Sin embargo, Tolkamp y Brouwer (1993), en una revisión de varios estudios sobre el tema, encontraron que la mayor digestibilidad total del ganado caprino frente al ovino (+ 0,8 %) pese a ser estadísticamente significativa, no tuvo ningún significado práctico en dietas ricas (> 10%) en proteína, aunque en su análisis si se confirmaba la mayor digestibilidad en cabras que en ovejas, pero menor que en bovino cuando se suministran dietas pobres en proteína. Recientemente se ha cuestionado la superioridad digestiva de la cabra frente a otras especies de rumiantes (Hadjigeorgiou *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2008). Probablemente, parte de las controversias encontradas en la bibliografía se deban a las diferentes dietas ensayadas. En pastoreo, el ganado caprino puede presentar una mayor capacidad digestiva que el ovino como consecuencia de una mayor capacidad para seleccionar el alimento. La versatilidad en el comportamiento alimenticio del ganado caprino parece ser consecuencia de ciertas adaptaciones anatómicas. Entre las adaptaciones anatómicas que convierten a la cabra en única Narjisse (1991) cita la agilidad, movilidad del labio superior y capacidad de adoptar una posición bípeda como determinantes en el proceso de selección del alimento cuando la disponibilidad de recursos de valor nutritivo alto escasea.

## 2.2. Fermentación ruminal y síntesis de proteína microbiana

### 2.2.1. Fementación ruminal

El rumen es una cámara de fermentación anaeróbica. La población microbiana que alberga (bacterias, arqueas, protozoos y hongos) se mantiene gracias a un entorno favorable (temperatura, anaerobiosis, pH, potencial redox, etc.) y a unas características anatómo-fisiológicas que permiten un aporte y evacuación continua de nutrientes y de los productos de la fermentación, respectivamente. El proceso de fermentación (**Figura 2.2**) transforma los sustratos, principalmente hidratos de carbono y proteínas, en productos, como ácidos grasos volátiles, CO<sub>2</sub>, metano, péptidos, aminoácidos, amoníaco y masa microbiana. Alguno de estos productos (ácidos grasos volátiles y amoníaco) son absorbidos a través de la pared ruminal y metabolizados por el propio rumiante.

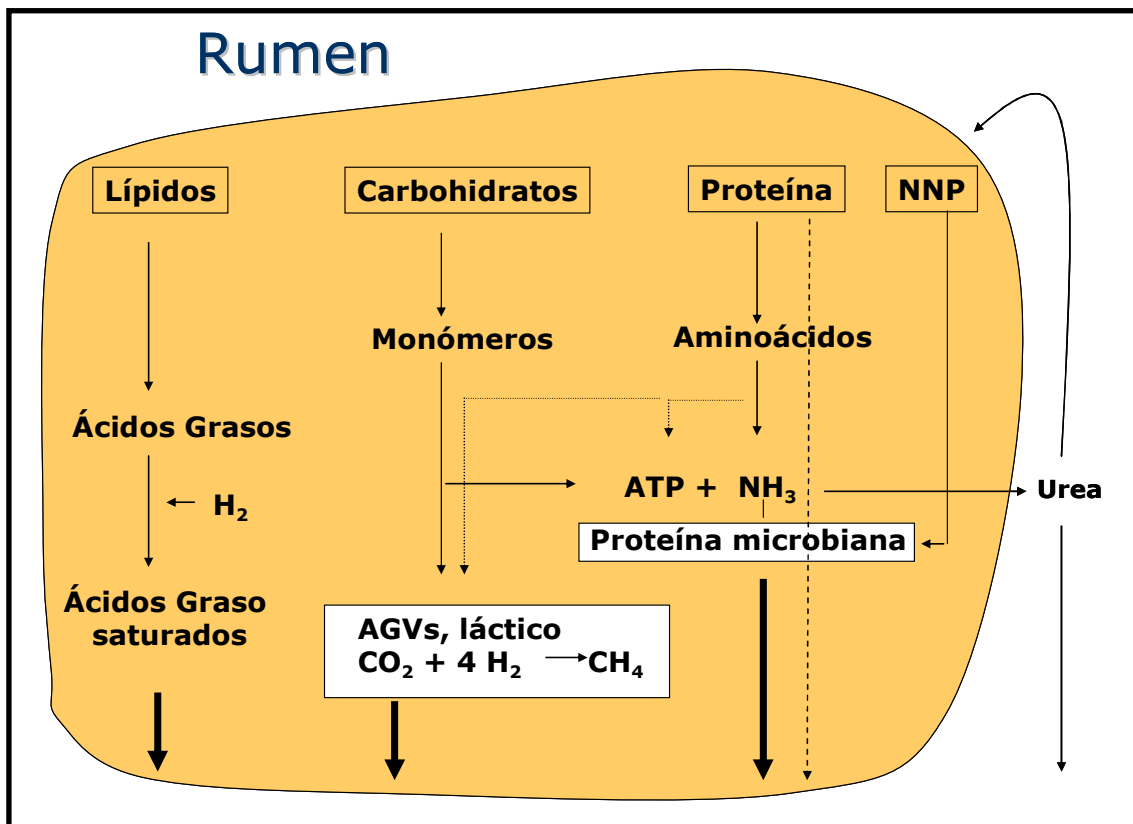
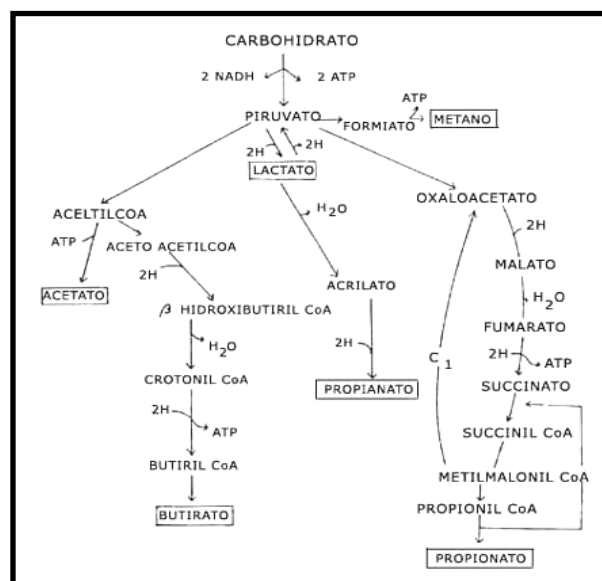


Figura 2.2. Metabolismo ruminal

El resto de los productos de la fermentación, junto con el alimento no fermentado en el rumen, pasan al abomaso y al intestino delgado, donde se digieren antes de ser absorbidos. La verdadera importancia de la fermentación ruminal radica en que permite al rumiante aprovechar alimentos que no pueden ser digeridos por sus propias enzimas, tales como los hidratos de carbono estructurales o los compuestos nitrogenados no proteicos.

En el rumen tiene lugar la degradación mayoritaria de los carbohidratos solubles (almidón y azúcares simples) y parte de los carbohidratos estructurales o fibrosos (celulosa, hemicelulosa y pectina), que contienen los alimentos. El grado y velocidad de degradación de los carbohidratos varía según su estructura (Varga y Kolver, 1997) y la población microbiana predominante (Sniffen *et al.*, 1983), factores íntimamente relacionados. Los carbohidratos se hidrolizan en el rumen por la acción de enzimas microbianas extracelulares (Williams *et al.*, 1989), liberándose oligosacáridos solubles, fundamentalmente hexosas y pentosas, que pueden ser utilizados por otros microorganismos, incapaces de actuar sobre los primeros, mucho más complejos (Osborne y Dehority, 1989). Los oligosacáridos fermentan, vía piruvato (**Figura 2.3**), formándose ácidos grasos volátiles, principalmente acético y, en menor medida, propiónico y butírico (Van Soest, 1982; Ørskov y Ryle, 1990).



**Figura 2.3.** Fermentación de los carbohidratos en el rumen

Los ácidos grasos volátiles son absorbidos a través de la mucosa ruminal (80 - 90 %; Weston y Hogan, 1968) y utilizados por el rumiante como principal fuente de energía. La estequiometría de la síntesis de cada ácido graso es distinta, por lo que la producción de diferentes cantidades de ácidos individuales dará lugar a eficiencias energéticas también distintas. Una fermentación que de lugar, mayoritariamente, a ácido propiónico, como ocurre con dietas ricas en concentrado, es más eficiente, desde el punto de vista energético, que aquella en la que predomine la formación de ácido acético, que caracteriza la fermentación de dietas ricas en forrajes. Esta última implica una liberación importante de H<sup>+</sup>, que se elimina en forma de metano y cuya síntesis representa un gasto de energía considerable (Ørskov y Ryle, 1990). Dado que la fermentación ruminal es un proceso anaerobio, la oxidación de los substratos no es completa y la eficiencia energética del proceso se considera baja.

Los microorganismos ruminales obtienen la mayor parte de la energía que requieren a partir de la fermentación de carbohidratos, puesto que la que pueden obtener de la proteína es reducida y entre las grasas, solamente fermenta el glicerol (Hvelplund y Madsen, 1985). Por ello, la disponibilidad de energía fermentable es el principal factor limitante del crecimiento microbiano en el rumen (Buttery y Lewis, 1982). El tipo de carbohidratos del alimento determina el tipo de microorganismos que prolifera en el rumen (Sniffen *et al.*, 1983). Así, dietas forrajeras, con alto contenido en carbohidratos estructurales, un mayor tiempo de retención de las partículas sólidas en el rumen y un pH ruminal cercano a la neutralidad, determinan la proliferación de bacterias celulolíticas (Weimer *et al.*, 1999). El grado de fermentación de los forrajes en el rumen varía en función de la familia botánica a la que pertenezca, el grado de madurez y estado fisiológico, la forma física de presentación, el procesado y la presencia de factores anti-nutritivos (Galyean y Goetsch, 1993). En el caso de dietas ricas en carbohidratos no estructurales (azúcares y almidones, fundamentalmente) los microorganismos que proliferan son aquellos con una alta actividad amilolítica (Theodorou y France, 1993). Este grupo de bacterias se caracteriza por presentar una velocidad de crecimiento rápida, gran afinidad por los substratos y tolerancia a valores de pH inferiores a 6,0 (Russell, 1991). Los granos de cereales constituyen la principal fuente de carbohidratos no

estructurales en las dietas de rumiantes, aunque el patrón de degradación de estos difiere notablemente dependiendo del tipo de cereal y de su procesado (Nozière y Michalet-Doreau, 1997; Archimède *et al.*, 1995).

La proteína de la dieta y la endógena se hidrolizan en el rumen dando lugar, sucesivamente, a compuestos nitrogenados más simples: péptidos, aminoácidos y amoníaco (Wallace, 1996). Los aminoácidos y péptidos pueden bien utilizarse directamente por los microorganismos ruminales, cuando existe energía para incorporarlos a la proteína microbiana que se sintetiza, previa o no la transaminación, o bien ser desaminados con fines energéticos hasta la formación de amoníaco y esqueletos carbonados (Maeng y Baldwin, 1976), si la energía es limitante.

Los microorganismos ruminales que degradan los carbohidratos estructurales, aquellos con actividad celulolítica, tienen una baja velocidad de crecimiento por lo que requieren unos bajos requerimientos de mantenimiento, utilizando el amoníaco como fuente principal de N (Bach *et al.*, 2005). Por el contrario, aquellos que degradan los carbohidratos no estructurales, microorganismos de actividad amilolítica, tienen mayores requerimientos para su mantenimiento debido a su alta tasa de crecimiento, utilizando tanto el amoníaco, péptidos y AA como fuentes de N (Russell *et al.*, 1992). A pesar de que existen varios estudios que confirman la capacidad de las bacterias celulolíticas para utilizar directamente los AA y péptidos para la síntesis de proteína microbiana, en detrimento del amoníaco, cuando aquellos están disponibles en elevadas cantidades en el medio (Cruz Soto *et al.*, 1994; Atasoglu *et al.*, 2001) y de que la población protozoaria no es capaz de utilizar el amoníaco (Onodera *et al.*, 1977), se estima que, con las concentraciones normales de AA y péptidos que existen en el rumen, cerca de un 80% del N microbiano procede del amoníaco (Bach *et al.*, 2005).

Al igual que en el caso de los carbohidratos, la velocidad de degradación de la proteína en el rumen depende de las características de la proteína (estructura química), y de la actividad proteolítica de los microorganismos ruminales (Leng y Nolan, 1984; Wallace, 1996). La actividad proteolítica está regulada por factores relacionados con la dieta, el régimen de alimentación, la relación forraje:concentrado, la forma de presentación de los ingredientes de la dieta y el procesado de los mismos (Broderick *et al.*, 1991; Stern *et al.*, 1994).

Estos factores pueden provocar cambios en el pH, en la velocidad de tránsito de la digesta a través del rumen y en la población microbiana predominante que, a su vez, pueden alterar la actividad proteolítica (Schadt *et al.*, 1999). De igual forma, estos factores afectan a la calidad de la proteína alimentaria no degradada en el rumen, que fluye al intestino delgado del rumiante (Stern *et al.*, 1994).

### **2.2.2. Síntesis de proteína microbiana**

Un aspecto clave de los procesos digestivos en los rumiantes es la síntesis de proteína microbiana en el rumen debido, fundamentalmente, a su gran contribución a la proteína total que llega al intestino delgado (Van Soest, 1982; Schniffen y Robinson, 1987; ARC, 1980; Stern *et al.*, 1994). En la digesta intestinal están presentes, además, proteína no degradada del alimento y proteína endógena. A pesar de que la síntesis de proteína microbiana es un factor primordial en los sistemas de valoración proteica de alimentos para rumiantes (Clark *et al.*, 1992; Firkins *et al.*, 1998), su cuantificación resulta enormemente compleja.

La síntesis de proteína microbiana implica el crecimiento y multiplicación de los microorganismos del rumen, y depende tanto de la cantidad de energía y nitrógeno (Bach *et al.*, 2005) como de la sincronía en la degradación de ambos. En la práctica, el flujo de proteína microbiana al intestino suele estimarse como la proteína de origen microbiano, sintetizada en el rumen, que fluye al duodeno, ya que esta constituye la fracción que realmente puede aprovechar el animal hospedador para cubrir sus necesidades. Sin embargo, síntesis neta y flujo no son conceptos equivalentes, debido a que un porcentaje de la proteína microbiana sintetizada en el rumen no fluye al intestino por procesos de reciclaje del N, principalmente como consecuencia de la predación de bacterias por protozoos (Firkins, 1996). Este reciclado del N microbiano en el rumen ha sido estimado en un 30 – 50% de la proteína microbiana sintetizada, aunque algunos autores han establecido rangos más amplios (20-90%), en función de la dieta suministrada al animal. La mayor parte del N microbiano tiene un origen bacteriano puesto que aunque los protozoos puedan representar un alto porcentaje de la microbiota ruminal, su retención selectiva o secuestro en el

rumen hace que su contribución al flujo duodenal de proteína microbiana sea menor (Veira, 1986).

Si la cuantificación de la proteína microbiana sintetizada en el rumen constituye un punto crítico para la valoración de alimentos para rumiantes, como ya se ha mencionado, alcanza una relevancia especial en animales de alta producción, en los que un aporte insuficiente de aminoácidos puede limitar la síntesis de proteína (Nocek y Russell, 1988). Sin embargo, su cuantificación y/o predicción proporcionan resultados extraordinariamente variables (NRC, 2001). Para su estimación se recurre al uso de marcadores, que permitan conocer la proporción de la proteína total que abandona el rumen que tiene origen microbiano. Se requiere conocer dos factores esenciales: la cantidad total del marcador microbiano que fluye al intestino delgado y, la concentración de dicho marcador en la masa microbiana (Brodiscou y Jouany, 1995).

En los experimentos realizados *in vivo* se mide el flujo total del marcador microbiano al abomaso o duodeno de animales canulados en tramos concretos del tracto digestivo (Faichney, 1993; Titgemeyer, 1997). La medida directa del flujo requiere la colección total de la digesta, mediante cánulas reentrantes (Beever *et al.*, 1974), aunque su implantación provoca alteraciones a nivel intestinal, que limitan la obtención de muestras representativas (Faichney, 1993; Dewhurst *et al.*, 2000). La medida indirecta del flujo puede realizarse empleando cánulas simples (tipo "T"), que permiten tomar muestras puntuales, representativas del flujo duodenal, estimándose el flujo total mediante marcadores de flujo. Aunque cada marcador presenta una serie de ventajas e inconvenientes, el método que implica el uso conjunto de dos marcadores: uno para la fase líquida y otro para la sólida (Firkins *et al.*, 1998), parece el más adecuado. Las dificultades para la estimación del flujo de proteína microbiana en los sistemas *in vitro* son similares a las descritas en animales. Sin embargo, los sistemas *in vitro* permiten cuantificar el flujo mediante la recogida total del efluente sin necesidad de marcadores de flujo, lo que representa una simplificación importante.

Aparte de la medida del flujo, la cuantificación de la síntesis de proteína en el rumen requiere diferenciar la proteína microbiana del resto de compuestos nitrogenados que fluyen al duodeno (Cecava *et al.*, 1990; Clark *et al.*, 1992; Broudiscou y Jouany, 1995) y, por tanto aislar una fracción

representativa de los microorganismos que abandonan el rumen. En la mayoría de los estudios la muestra de microorganismos tomada como referencia se ha obtenido a partir de la fase líquida del contenido del rumen (Broderick y Merchen, 1992; Titgemeyer, 1997), debido a la facilidad que implica su aislamiento. Sin embargo, este tipo de muestras no incluye las bacterias asociadas a la fase sólida del contenido ruminal ni los protozoos. La contribución de las bacterias asociadas a la fase sólida al flujo de N microbiano es importante y, su ausencia en la fracción bacteriana de referencia podría implicar una estimación errónea del marcador microbiano en las bacterias que fluyen al duodeno, factor que influye enormemente en la variabilidad de las estimaciones realizadas (Dewhurst *et al.*, 2000; Tas y Susenbeth, 2007). En relación a la población de protozoos, parece existir controversia respecto a su verdadera contribución al flujo microbiano al duodeno, con estimaciones que van desde el 10 hasta el 80 % del total del N microbiano (Coleman, 1979), dependiendo del tipo de dieta. Trabajos más recientes coinciden en una contribución no superior al 30 % de los protozoos (22 %, Dijkstra *et al.*, 1998; 19-29 Reynal *et al.*, 2003; 21-25 %, Yáñez-Ruiz *et al.*, 2006). En los sistemas de simulación de flujo continuo la contribución es nula (Moumen *et al.*, 2008) baja (Hoover *et al.*, 1976) o similar (Muetzel *et al.*, 2009), respecto a la hallada en el rumen.

#### **2.2.2.1. Marcadores microbianos**

Según Broderick y Merchen (1992) un marcador microbiano ideal debería i) ser fácil de determinar y cuantificar, ii) no formar parte de los alimentos que reciben los animales, iii) distribuirse de manera uniforme en todas las especies microbianas ruminales y, iv) ser biológicamente estable. A estos requisitos Dehority (1995) añadió 3 más: v) no ser absorbido en el tracto digestivo, vi) estar presente en una proporción constante en los microorganismos ruminales, en todas las fases de su crecimiento y, vii) que todas sus formas tengan el mismo ritmo de tránsito a través del tracto digestivo. Ninguno de los marcadores que se utilizan cumplen todos los requisitos señalados anteriormente (Broderick y Merchen, 1992; Obispo y Dehority, 1999) y la elección de uno resulta especialmente complicada.



Se consideran dos grandes grupos de marcadores microbianos: internos y externos. Los marcadores internos son constituyentes de las células microbianas mientras que los externos deben ser administrados a los animales experimentales. El ácido diaminopimélico o DAPA (Hutton *et al.*, 1971) y las bases púricas (Zinn y Owens, 1986) son los marcadores microbianos internos más utilizados, mientras que el  $^{15}\text{N}$  (Brandt *et al.*, 1980), es el marcador microbiano externo más empleado. Broderick y Merchen (1992), tras analizar varios marcadores microbianos, llegaron a la conclusión de que la estimación era más precisa cuando se utilizan purinas o  $^{15}\text{N}$ . Estos autores recomendaron las bases púricas por la sencillez de su análisis, aunque consideraron el  $^{15}\text{N}$  como más preciso y adecuado, con un gran inconveniente que radica en su elevado coste.

Las bases púricas (adenina y guanina) son compuestos nitrogenados heterocíclicos que, junto con las bases pirimidínicas (citosina y timina), forman parte de los nucleótidos que integran los ácidos nucleicos. Su utilización, como marcadores microbianos internos, se fundamenta en las altas concentraciones de ácidos nucleicos, especialmente ARN, presentes en los microorganismos unicelulares del rumen (Broderick y Merchen, 1982) así como en el hecho de que la mayor contribución al flujo duodenal de ácidos nucleicos es de origen microbiano (McAllan y Smith, 1973; Kanjanapruthipong y Leng, 1998). Su utilización se remonta varias décadas atrás cuando algunos autores observaron que la síntesis de proteína microbiana en el rumen guardaba relación con el flujo total de polinucleótidos (Ellis y Pfander, 1965) y con la excreción urinaria de derivados metabólicos de las bases púricas (Topps y Elliot, 1965). Desde entonces su uso ha adquirido gran relevancia, siendo numerosos los autores que han utilizado estos marcadores para la estimación de la síntesis de proteína microbiana, tanto *in vivo* (Pérez *et al.*, 1996; Martín-Orúe *et al.*, 2000) como *in vitro* (Calsamiglia *et al.*, 1996; Carro y Miller, 1999; Moumen *et al.*, 2008). Una de las ventajas de este marcador microbiano es que su análisis (Zinn y Owens, 1986) es simple, rápido y relativamente barato. Este método consiste en hidrolizar las purinas con una solución de ácido perclórico, precipitarlas con nitrato de plata y cuantificarlas mediante espectrofotometría. Sin embargo, Makkar y Becker (1999) observaron que la recuperación de purinas a partir de extractos bacterianos ruminales, a los que se había añadido

celulosa, almidón y fibra neutro detergente, era solamente del 50% cuando se empleaba este método, mientras que la utilización de la técnica descrita por Balcells *et al.* (1992), mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), permitía una recuperación de las purinas cercana al 100%. Sin embargo, este marcador microbiano presenta algunos inconvenientes que merecen ser descritos en detalle:

**1) Los ingredientes de la dieta, no degradados en el rumen, pueden contribuir, de forma variable, al flujo duodenal de ácidos nucleicos, lo que cuestionaría la asunción de que el flujo de purinas al duodeno sea exclusivamente de origen microbiano.**

Aunque la mayor parte de los alimentos utilizados en los rumiantes presentan contenidos bajos en purinas, en relación al de los microorganismos ruminales, algunos (p.e. harina de pescado) pueden presentar valores que sólo están ligeramente por debajo de los encontrados en los microorganismos por algunos autores (Titgemeyer *et al.*, 1989; Pérez *et al.*, 1996; Carro y Miller, 2002). McAllan y Smith (1973) observaron que cuando se introducían ácidos nucleicos libres en el rumen, se degradaban rápidamente a nucleósidos y bases, las cuales eran posteriormente catabolizadas (McAllan y Smith, 1973). Sin embargo, la situación puede ser diferente en el caso de los ácidos nucleicos contenidos en los alimentos, ya que se encuentran protegidos por las estructuras resistentes de la pared celular (McAllan, 1982). La degradabilidad de las purinas de origen alimenticio se ha determinado en algunos estudios, pero los resultados obtenidos son contradictorios. Algunos autores (McAllan y Smith, 1973; Calsamiglia *et al.*, 1996; Hristov *et al.*, 2005) consideran que el flujo duodenal de purinas de origen alimenticio es insignificante. Otros estudios, en los que se emplearon ácidos nucleicos microbianos marcados con  $^{32}\text{P}$  (Smith *et al.*, 1978) o con  $^{15}\text{N}$  (Pérez *et al.*, 1997; Vicente *et al.*, 2004), señalan que, dependiendo de la ración ingerida por los animales, hasta un 30-35% del flujo duodenal de purinas puede ser de origen alimenticio, lo que provocaría una sobreestimación de la síntesis de proteína microbiana cuando se utilizan las bases púricas como marcador.

**2) La concentración de purinas es diferente en los distintos grupos microbianos (protozoos y bacterias, fundamentalmente) e, incluso, en distintas especies bacterianas. Por ello, es de gran importancia obtener una fracción, lo más representativa posible, de los microorganismos que abandonan el rumen.**

Diversos autores utilizan un valor constante de la relación bases púricas:N en la masa microbiana que fluye al duodeno (Zinn y Owens, 1986; Chen *et al.*, 1990; Balcells *et al.*, 1991; Belenguer *et al.*, 2002). Sin embargo, la relación purinas/N no es igual en bacterias que en protozoos (Robinson *et al.*, 1998), por lo que la ausencia de protozoos en la fracción microbiana aislada como referencia podría sesgar los resultados, ya que la contribución de los protozoos al flujo total de N al duodeno, aunque variable, es significativa (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2006). Por otro lado, tanto en estudios *in vivo* (Cecava *et al.*, 1990; Pérez *et al.*, 1996, 1998; Martín-Orúe *et al.*, 1998; Dewhurst *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2000; Bessa *et al.*, 2009) como *in vitro* (Carro y Miller, 2002; Rodríguez-Prado *et al.*, 2004; Vlaeminck *et al.*, 2007) se ha observado que las BAS presentan un menor contenido en purinas y una menor relación purinas/N que las BAL. Las diferencias entre las fracciones BAS y BAL se han atribuido a la presencia de distintas especies bacterianas en ambas y al menor ritmo de crecimiento de las BAS en comparación con las BAL (Bates *et al.*, 1985; Czerkawski, 1986; Obispo y Dehority, 1999; Carro y Miller, 2002). En buena parte de los trabajos en los que se ha determinado la síntesis de proteína microbiana utilizando las purinas como marcador, se ha empleado BAL como fracción de referencia, lo que provoca una subestimación de la SPM, tal y como se ha observado en los escasos estudios en los que se han comparado los resultados obtenidos con ambas fracciones bacterianas (Pérez *et al.*, 1998; Carro y Miller, 2002; González-Ronquillo *et al.*, 2003; Rodríguez-Prado *et al.*, 2004; Molina-Alcaide *et al.*, 2008). Las bacterias asociadas a la fase sólida son predominantes en el contenido ruminal (Craig *et al.*, 1987), llegando incluso a constituir un 90 % del total en animales que reciben raciones constituidas únicamente por forrajes (Merry y McAllan, 1983). Sin embargo, su proporción relativa en el flujo microbiano puede no ser tan importante ya que su tasa de evacuación es menor que la de las bacterias presentes en la fase líquida (Firkins *et al.*, 2006), de tal forma que las bacterias que fluyen al duodeno

contienen mayor proporción de LAB que el contenido ruminal (Hristov y Broderick, 1996; Ahvenjärvi *et al.*, 2002). Su contribución relativa al flujo microbiano al duodeno ha sido estimada, encontrándose resultados muy variables (Carro y Miller, 2002; Rodríguez *et al.*, 2000; Vlaeminck *et al.*, 2007). Probablemente la utilización de métodos basados en técnicas moleculares (Firkins y Yu, 2006) o el estudio de la composición en isómeros de ácidos grasos, muy específicos de grupos bacterianos (Vlaeminck *et al.*, 2006), podría contribuir a establecer de una manera mas precisa este aspecto. Los sistemas de cultivo continuo, que simulan la fermentación ruminal, permiten aislar las bacterias a partir de la digesta (efluentes) que realmente abandona el rumen (vaso del fermentador), con lo que una solución al problema que plantea la elección de BAL y BAS, y de sus proporciones óptimas, sería el aislamiento de las bacterias totales a partir de los efluentes (Carro, 2001). A pesar de que existen diversos procedimientos para aislar la fracción de BAS, su eficacia suele ser baja debido a que estas bacterias se encuentran firmemente adheridas a las partículas de alimento. La mayoría de los métodos utilizados para desligar las BAS de las partículas de alimento permiten liberar entre un 30 y un 60 % de las mismas (Merry y McAllan, 1983; Martín-Orúe *et al.*, 1998), aunque algunos autores (Whitehouse *et al.*, 1994; Ranilla *et al.*, 2001) han utilizado procedimientos que permiten desligar aproximadamente un 80 %. Sin embargo, algunos de estos tratamientos pueden afectar a la integridad de las bacterias y ocasionar pérdidas celulares, que modifican la relación purinas/N, tal y como han observado Martín-Orúe *et al.* (1998) y Carro y Miller (2002). Por otra parte, incluso cuando se han aplicado tratamientos que permiten desligar un alto porcentaje de las BAS, su recuperación final es inferior al 60 % (Ranilla *et al.*, 2001).

**3) La concentración de purinas en las fracciones bacterianas de referencia comúnmente utilizadas (BAL y BAS) varía en función de la dieta administrada, del plano de alimentación y del momento en que se aísle la fracción bacteriana, con respecto a la administración de la ración.**

El hecho de que determinados autores (Rodríguez *et al.*, 2000; Ranilla y Carro, 2003; Reynal y Broderick, 2005) hayan advertido que la concentración

de purinas o, mas concretamente, el cociente purinas:N en los extractos aislados pueda variar en función de los tratamientos estudiados, contrasta tanto con el valor constante purinas:N propuesto por algunos autores para calcular el flujo de N microbiano a partir del flujo de BP al duodeno (Zinn y Owens, 1986; Chen *et al.*, 1990; Belenguer *et al.*, 2002) como con otros estudios en los que no se han encontrado efecto de los tratamientos sobre dicho cociente (Martín-Orúe *et al.*, 2000). Sin embargo la cuestión no es un asunto trivial, puesto que discrepancias en la concentración del marcador en las bacterias aisladas, en función de la dieta recibida, podrían determinar flujos de N microbiano con un patrón de respuesta a los tratamientos diferente al encontrado a nivel del flujo duodenal de bases púricas (Molina-Alcaide *et al.*, 2008), principal indicador de la síntesis de proteína microbiana (Chen *et al.*, 1990).

#### **4) Imprecisiones inherentes a los procesos de aislamiento y análisis del contenido en purinas de las fracciones microbianas.**

Estas imprecisiones pueden alterar enormemente el valor final de este parámetro y, por tanto, la estimación del flujo de N microbiano (Tas y Susenbeth, 2007). La **Tabla 2.2** recoge los valores más dispares de la relación BP:N, encontrados en la bibliografía, y cuya aplicación a un mismo flujo teórico de BP proporciona valores del flujo duodenal de N microbiano distintos. Se muestran únicamente los datos derivados de los estudios realizados en pequeños rumiantes. Algunos procedimientos empleados en el aislamiento de las fracciones bacterianas pueden inducir rotura de las bacterias y, en consecuencia, pérdidas celulares (Martín-Orúe *et al.*, 1998; Carro y Miller, 2002) e incluso, la obtención de extractos bacterianos contaminados con partículas de alimento (Obispo y Dehority, 1999), que modifiquen la relación purinas/N. La extracción de las purinas contenidas en células bacterianas es también una fuente de variación, debido a una recuperación incompleta de las mismas por interferencia de la matriz que las contiene (Makkar y Becker, 1999; Reynal *et al.*, 2003).

**Tabla 2.2.** Valores de la relación bases púricas:nitrógeno (BP:N, mmol/g) en bacterias asociadas a la fase sólida (BAS) y líquida (BAL) del contenido del rumen de ovino y caprino y flujo de nitrógeno microbiano (FNM) estimado para un flujo teórico de bases púricas de 10 mmoles/día

| Autores                          | BP:N |      | Dieta                   | FNM, g/día |      |
|----------------------------------|------|------|-------------------------|------------|------|
|                                  | BAL  | BAS  |                         | BAL        | BAS  |
| Pérez <i>et al.</i> , 1996       | 0,86 | 0,60 | Heno:concentrado 67:33  | 11,6       | 16,7 |
| Pérez <i>et al.</i> , 1998       | 1,91 | 1,71 | Paja:cebada grano 50:50 | 5,2        | 5,8  |
| Martín-Orúe <i>et al.</i> , 1998 | 1,89 | 1,28 | Paja:cebada grano 20:80 | 5,3        | 7,8  |
| Rodríguez <i>et al.</i> , 2000   | 1,07 | 0,77 | Heno:concentrado 67:33  | 9,3        | 13,0 |
| Chen <i>et al.</i> , 1990        | 1,66 | -    | -                       | 6,0        |      |
| Belenguer <i>et al.</i> , 2002   | 1,97 |      |                         | 5,1        |      |

Por último, destacar que aunque las bajas recuperaciones de purinas totales, obtenidas con el método espectrofotométrico (Zinn y Owens, 1986; Makkar y Becker, 1999; Reynal *et al.*, 2003), hayan sido superadas con la metodología de análisis HPLC (Balcells *et al.*, 1992), estudios recientes apuntan a que existe un alto porcentaje de purinas, contenidas en los microorganismos ruminales, que se transforman en sus metabolitos, xantina e hipoxantina (Reynal y Broderick, 2009), y a que los métodos actuales de análisis son incapaces de separar, en el proceso de integración y cuantificación, la guanina de estos metabolitos (Reynal y Broderick, 2005).

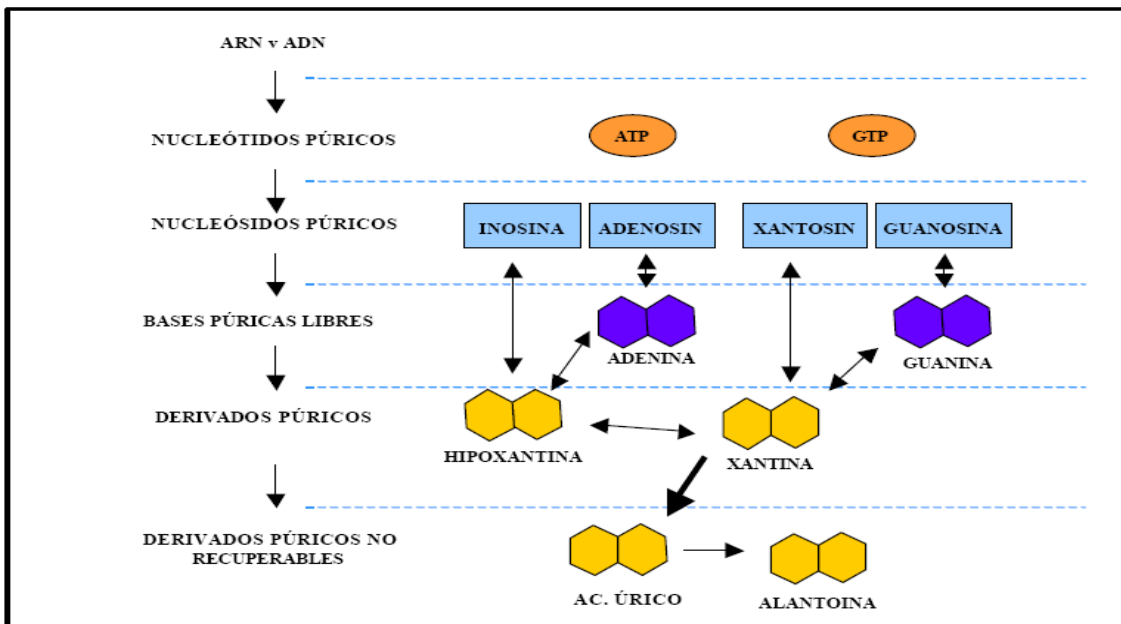
El empleo de técnicas moleculares en los últimos años, como la PCR a tiempo real (qPCR), está permitiendo una estimación más precisa de la contribución microbiana al flujo duodenal de N y dada la especificidad de las secuencias génicas, es también posible diferenciar con precisión la contribución bacteriana de la protozoaria (Sylvester *et al.*, 2005; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2006). En ese sentido, Belanche *et al.* (2006), determinaron el flujo de N bacteriano y protozoario al abomaso y duodeno de corderos en fase de engorde y, observaron que los protozoos contribuyen en un 13 % al flujo total microbiano y, que el uso de las bases púricas, como marcador microbiano, sobreestima en un 19 y un 48 %, respectivamente, el flujo al abomaso y duodeno, estimados mediante qPCR.

#### **2.2.2.2. Excreción de derivados púricos en orina**

La excreción de derivados púricos (alantoína, ácido úrico, hipoxantina y xantina) en orina es un método fiable y no invasivo, que se utiliza frecuentemente para la estimación del flujo de N microbiano al duodeno de rumiantes. El método asume que el flujo de ácidos nucleicos y el de sus derivados al duodeno tiene un origen principalmente microbiano, siendo las bases púricas (BP; adenina y guanina) que integran los ácidos nucleicos, catabolizadas hasta los derivados púricos (DP; alantoína, ácido úrico, hipoxantina y xantina) conforme se digieren y absorben en el intestino delgado (**Figura 2.4**). Estos DP son excretados en orina y, por tanto, su cuantificación proporciona una estimación indirecta del flujo de N microbiano.

Terroine y Mourot (1931) observaron que la excreción de la alantoína en la orina de ovinos aumentaba al hacerlo el nivel de proteína ingerida. Desde

entonces, numerosos trabajos de investigación han contribuido a esclarecer el mecanismo por el que la SPM se relaciona con la excreción de DP en orina. Pueden distinguirse dos grupos de trabajos: 1) observación de los cambios en la excreción de DP en orina, inducidos por factores relacionados con la dieta y, 2) propuesta de modelos que expliquen la relación existente entre ambos factores, mediante ecuaciones de correlación. Entre los primeros destaca el estudio de Blaxter y Martín (1962) quienes mostraron que la excreción de alantoína en orina respondía a la infusión de caseína en el rumen pero no en el abomaso, quedando patente que la excreción de este derivado púrico se relacionaba con algún factor involucrado en la fermentación ruminal. Elliot y Topps (1963) observaron la estrecha relación existente entre la concentración de ácidos nucleicos en el rumen y la excreción de alantoína y ácido úrico en orina y sugirieron, por primera vez, la posibilidad de utilizar la excreción urinaria de DP como indicador de la síntesis de proteína microbiana.



**Figura 2.4.** Metabolismo de los ácidos nucleicos

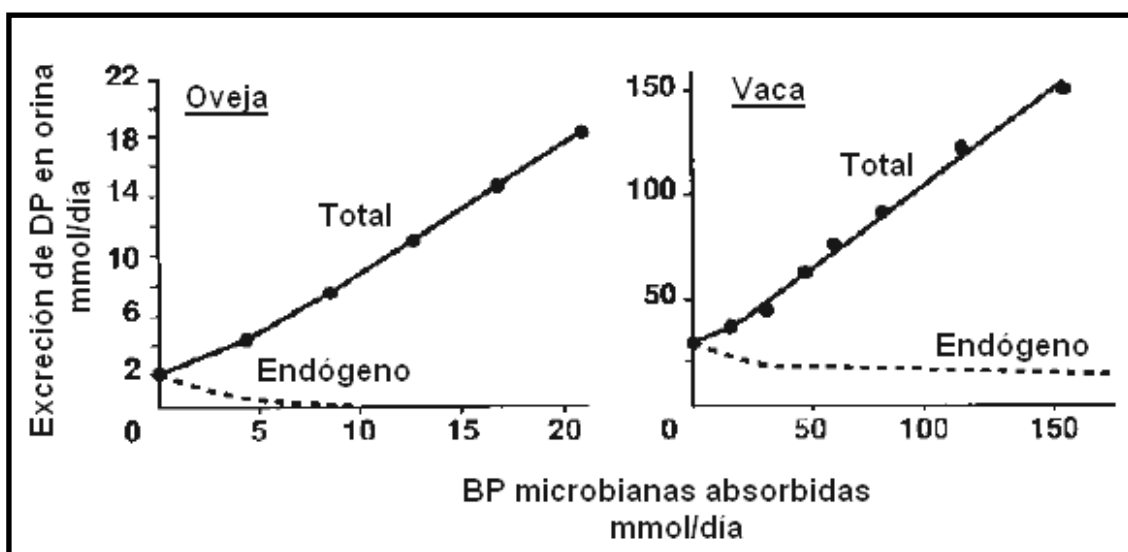
A partir de la década de los 80 numerosos autores han llevado a cabo estudios dosis-respuesta, encaminados a establecer ecuaciones de correlación entre el flujo de BP infundidas en duodeno y la cantidad de DP excretados en la orina de ganado vacuno (Verbic *et al.*, 1990; Vagnoni *et al.*, 1997; Orellana-Boero *et al.*, 2001; González-Ronquillo *et al.*, 2003) ovino



(Chen *et al.*, 1990; Balcells *et al.*, 1991) y caprino (Belenguer *et al.*, 2002; Mota *et al.*, 2008), que pudiesen aplicarse, en condiciones prácticas, para estimar indirectamente el flujo de N microbiano al duodeno. En todos los modelos propuestos la pendiente de la recta de regresión alude a la tasa de recuperación urinaria de las purinas infundidas en duodeno, cuyo valor se ha establecido para los pequeños rumiantes en un estrecho margen de entre 0,70 y 0,80 (Chen *et al.*, 1990; Balcells *et al.*, 1991; Belenguer *et al.*, 2002; Mota *et al.*, 2008). El término recuperación urinaria de las BP infundidas tiene en cuenta tanto la digestibilidad de las BP en intestino (alrededor de 0,8 – 0,90; Chen *et al.*, 1990; Belenguer *et al.*, 2002) como la excreción de los DP por otras vías diferentes a la urinaria. Este último componente está relacionado con la tasa de recuperación urinaria de los DP o de las BP absorbidas y se ha estimado en 0,84 (Chen *et al.*, 1990) y 0,88 (Balcells *et al.*, 1991).

La posibilidad de establecer una relación constante entre la excreción urinaria de DP y el aporte de BP al duodeno se ve dificultada por el hecho de que parte de los DP excretados en orina proceden de la renovación tisular de los ácidos nucleicos, que implica síntesis de novo de bases púricas, a partir de glicina, aspartato, glutamina y ácido fórmico, y recuperación de BP exógenas a partir de los denominados DP reciclables (xantina e hipoxantina), que constituye el componente endógeno de la excreción de DP en orina, en contraposición al componente exógeno procedente del flujo duodenal de BP. Es por ello que la mayoría de los modelos dosis-respuesta han calculado el valor de la excreción endógena con diferentes aproximaciones: ayuno prologando (Chen *et al.*, 1996; Liang *et al.*, 1999; Belenguer *et al.*, 2002), administración de dietas lácteas en animales con el reflejo de la gotera esofágica condicionado (Smith *et al.*, 1975; Antoniewicz *et al.*, 1983), alimentación intragástrica e incorporación del quimo (Chen *et al.*, 1990), técnicas isotópicas (Pérez *et al.*, 1998; Orellana Boero *et al.*, 2001). Todos incorporan en sus ecuaciones el término que alude al porcentaje de DP en orina de origen endógeno y que representa la ordenada en el origen de la ecuación de regresión hallada. Sin embargo, dadas las diferencias entre las especies animales, en relación al componente endógeno de la excreción urinaria de DP (Chen y Gomes, 1992), especialmente debidas a la distinta actividad de la enzima xantina oxidasa en el duodeno y el hígado (Al-Khalidi y

Chaglassian, 1965; Belenguer *et al.*, 2002), el término “endógeno” no tiene la misma importancia en ganado vacuno que en pequeños rumiantes (**Figura 2.5**), de tal forma que algunos autores (Chen *et al.*, 1990; Balcells *et al.*, 1991; Belenguer *et al.*, 2002), que han modelado la respuesta de la excreción urinaria de DP en ovino y caprino, han asumido una contribución despreciable del componente endógeno cuando la situación de los animales pasa de submantenimiento a mantenimiento. Sin embargo, ese componente si se ha considerado en caprino en lactación (Mota *et al.*, 2008).



**Figura 2.5.** Excreción urinaria de los derivados púricos (DP) en oveja y vaca en relación a la cantidad de bases púricas (BP) absorbidas (Chen *et al.*, 1990 y Verbic *et al.*, 1990, respectivamente). La línea discontinua representa la contribución neta de la degradación de los ácidos nucleicos en los tejidos a los DP excretados en orina (Chen y Gomes, 1992).

Algunos inconvenientes relativos a la utilización de la excreción de los DP en orina como índice del flujo duodenal de N microbiano derivan de aquellos problemas mencionados para las purinas como marcador microbiano. Por otro lado, el que los diferentes modelos utilizados en pequeños rumiantes hayan empleado un número pequeño de animales (Chen *et al.*, 1990 [6]; Balcells *et al.*, 1991 [4]; Belenguer *et al.*, 2002 [3]; Mota *et al.*, 2008 [3]), unido a la variabilidad entre animales encontrada en la recuperación urinaria (Belenguer *et al.*, 2002; Mota *et al.*, 2008), subraya la necesidad de realizar más

investigaciones en este campo para afianzar la fiabilidad de los modelos de predicción. Firkins *et al.* (2006) han considerado que los problemas derivados de los modelos propuestos en ganado vacuno para la estimación del flujo de N microbiano, a partir de la excreción de DP en orina, radican en: i) desconocimiento de la verdadera ordenada en el origen (componente endógeno), que influye enormemente en la pendiente de la ecuación por la alta correlación existente entre ambos parámetros; ii) errores potenciales inherentes al cálculo de BP infundidas, que aunque se controle, contiene toda la variabilidad del modelo e influye enormemente en la fiabilidad del mismo. Una de las ventajas de estos modelos es que la variabilidad de la excreción de los DP en orina es menor que la de la del flujo de BP al duodeno (González-Ronquillo *et al.*, 2004) aunque la ecuación de predicción ignora la variabilidad del flujo de BP al duodeno, del que depende íntimamente; iii) la predicción de las BP absorbidas en duodeno depende notablemente de la ecuación elegida, que difiere de unos autores a otros para una misma especie animal; iv) los errores cometidos en la predicción del flujo duodenal de N microbiano a partir de la excreción urinaria de los DP pueden aumentar por el uso de los distintos valores BP/N encontrados en la bibliografía.

Chen y Gomes (1992) consideran que el flujo de N microbiano al duodeno, calculado a partir de la excreción de DP en orina, no debe considerarse en términos absolutos, a pesar de que exista una correlación con otros métodos de estimación, y aconsejan su utilidad cuando se pretendan comparar tratamientos dentro de un mismo experimento.

### **2.3. Simulación *in vitro* de la fermentación ruminal**

La aproximación cuantitativa al conocimiento de las reacciones que se desarrollan en el rumen y, de los productos resultantes, es sumamente compleja, debido a la simultaneidad de procesos como la fermentación, secreción, flujo y absorción de nutrientes que tienen lugar. Por otra parte, el estudio de la microbiota ruminal está muy influenciado por la interacción de esta con el animal hospedador. Es por ello, que desde hace más de un siglo se viene desarrollando una serie de sistemas, que intentan simular los procesos de la fermentación ruminal, en condiciones de laboratorio, más o menos controladas. La posibilidad de simplificar y la eliminación de

importantes fuentes de variabilidad inherentes al ambiente ruminal (Bryant y Robinson, 1968), que ofrecen las técnicas de simulación están contribuyendo a conocer mejor el ecosistema ruminal y su funcionamiento.

Los primeros sistemas de simulación *in vitro* eran simples y cerrados. En recipientes de vidrio inoculados con líquido ruminal filtrado, y mantenidos en anaerobiosis y a una temperatura similar a la del rumen, se incubaban diferentes substratos durante un periodo corto de tiempo (Tappeiner, 1884; Woodman y Evans, 1938; Pearson y Smith, 1943). A pesar de su simplicidad estos sistemas permitieron importantes avances en el conocimiento del metabolismo ruminal. Tappeiner (1884) fue el primero en investigar la degradación de la celulosa en el rumen, y observó que el papel y el algodón desaparecían lentamente cuando se incubaban en líquido ruminal en condiciones anaeróbicas. A esa desaparición se asociaba la producción de metano, dióxido de carbono y ácidos grasos volátiles. Más tarde (1888) Tappeiner destiló los productos de la fermentación de la celulosa, y concluyó que los ácidos acético y butírico son los principales productos de dicha fermentación. Woodman y Evans (1938) establecieron que la glucosa es un intermediario de la digestión de la celulosa en el rumen y, que los productos finales de la fermentación son el piruvato, lactato y los ácidos grasos volátiles. Pearson y Smith (1943) consideraron que la interpretación de los resultados, obtenidos *in vivo*, en cuanto a la utilización del nitrógeno no proteico en rumiantes, es bastante difícil y apuntaron la posibilidad de que mediante métodos *in vitro*, en los que las condiciones de la fermentación se pudiesen simplificar, resultaría más fácil explicar ciertos aspectos del metabolismo de la urea y del amoníaco en el rumen. Estos autores demostraron, con un sencillo sistema de simulación que la urea que entra en el rumen se transforma totalmente en amoníaco en la primera hora de incubación, y que ello constituía la primera fase del proceso de síntesis de proteína microbiana a partir de nitrógeno no proteico. Marston (1948) diseñó un sistema de simulación bastante más complejo para analizar los productos de la fermentación de la celulosa. La saliva artificial, formulada por McDougall (1948), ha sido de gran importancia para el desarrollo de sistemas de fermentación *in vitro* más complejos (Johnson, 1966) ya que permite simular el efecto tampón de la saliva del rumiante, de forma más precisa que otras fórmulas empleadas.

Adler *et al.* (1958) cuestionaron la validez de los cultivos no renovados para simular la fermentación ruminal, y plantearon un sistema de flujo continuo, capaz de mantener el crecimiento microbiano constante y similar al que tiene lugar en el rumen. La analogía entre los sistemas de cultivo continuo y el rumen fue reconocida por varios autores de la época (Hobson, 1965; Hungate *et al.*, 1966). Warner (1956) y Davey *et al.* (1960) enumeraron una serie de criterios para validar los sistemas *in vitro* como simuladores de las condiciones *in vivo*: i) que permitan mantener el número, la apariencia y la proporción de los microorganismos ruminales en niveles similares a los encontrados *in vivo*; ii) que se mantengan tasas normales de digestión de la celulosa, almidón y proteína así como de su interacción y; iii) que permitan predecir cuantitativamente los resultados *in vivo*. Sin embargo, Johnson (1963) manifestó que las desventajas que podría representar el no tener en cuenta alguno de los criterios mencionados se compensaba en muchas situaciones con la obtención de la valiosa información derivada de la simplificación del ambiente ruminal. Uno de los primeros sistemas de cultivo continuo fue el desarrollado por Slyter *et al.* (1964) que, gracias a su capacidad de mantenerse operativo durante varias semanas, permitió estudiar la adaptación de la población microbiana, establecida en el sistema *in vitro* a determinadas condiciones o tratamientos. Los sistemas de simulación se han hecho más complejos para representar, de forma cada vez más fidedigna, las condiciones del rumen (Hoover *et al.*, 1976; Czerkawski y Breckenridge, 1977; Crawford *et al.*, 1980; Abe y Kurihara, 1984; Merry *et al.*, 1987; Mietinen y Setälä, 1989). Los diferentes sistemas no son más que distintas formas de resolver ciertos problemas que se plantean ante necesidades particulares del trabajo a abordar. Así, parece conveniente utilizar aquellos sistemas de diseño más complejo para estudios básicos de la función ruminal, y usar las versiones más sencillas para ensayos preliminares, o bien, para trabajos de monitorización o valoración nutritiva (Czerkawski, 1986). Los sistemas más simples permiten emplear un mayor número de réplicas en cada experimento, su coste es menor y su manipulación más sencilla. También el grado de homogeneidad en los resultados obtenidos es tanto mayor cuanto más sencillo sea el sistema (Czerkawski, 1986).

En la actualidad los sistemas de simulación se clasifican, atendiendo al tipo de flujo que se establezca en su interior, en tres categorías (Blanchart *et al.*, 1989): 1) continuos, con entrada constante de alimento y solución tampón y salida, también continua, de los productos de la fermentación; 2) semicontinuos, con entrada de solución tampón y salida de los productos de fermentación continuas pero, en los que el substrato se suministra de forma intermitente y; 3) cultivos no renovados, herméticos, en los que no existe ni entrada de substrato ni salida de los productos de fermentación durante el tiempo de incubación. En una revisión reciente, de los trabajos científicos realizados a partir de la década de los 80 con sistemas de simulación (Kajikawa *et al.*, 2003), se observa que los fermentadores de flujo continuo doble (FFCD), desarrollados por Hoover *et al.* (1976) y los de flujo semicontinuo o Rusitec (Rumen Simulation Technique), descritos por Czerkawski y Breckenridge (1977), son los más empleados en la actualidad. En los sistemas de cultivo continuo se consideran también los fermentadores de flujo continuo simple (FFCS), en los que se equiparan las tasas de dilución de líquidos y sólidos. Estos fermentadores son ampliamente utilizados con éxito (Dahlberg *et al.*, 1988; Fellner *et al.*, 1995; Karunanandaa y Varga, 1996; Bach *et al.*, 1999; Meng *et al.*, 1999; Tapia *et al.*, 2002; Martín-García *et al.*, 2004; Moumen *et al.*, 2008) como simuladores de la fermentación ruminal (Carro *et al.*, 2009).

La mayor parte de los autores que han utilizado y utilizan las técnicas de simulación coinciden en que los ensayos *in vivo* implican un elevado coste de mantenimiento de los animales experimentales. Además, es necesario realizar intervenciones quirúrgicas invasivas a diferentes niveles del tracto digestivo, utilizar gran cantidad de dietas experimentales así como establecer períodos amplios de adaptación de los animales a dichas dietas. A esos inconvenientes se añaden, la variabilidad individual y el bajo grado de control y monitorización de las condiciones del ecosistema ruminal, así como la complejidad para determinar el componente endógeno de la proteína que llega al intestino y otras dificultades inherentes a la estimación del flujo de nutrientes que abandonan el rumen. Además de representar una alternativa para superar todos o alguno de esos inconvenientes, los sistemas de simulación, permiten abordar estudios que estarían desaconsejados en experimentos *in vivo* porque

implican el uso de sustancias prohibidas en la alimentación de rumiantes (por ej. antibióticos). El uso de organismos modificados genéticamente (Koch *et al.*, 2006), dietas con un solo componente (Crawford *et al.*, 1983), sustancias que pueden resultar tóxicas para el animal (Seeling *et al.*, 2006; Strobel *et al.*, 2008) etc., puede también estudiarse *in vitro* con menos riesgos que en los animales.

El empleo de técnicas de simulación es de gran utilidad para obtener información relevante acerca del metabolismo ruminal (Merry *et al.*, 1987) como:

- Efectos de diferentes fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento microbiano y/o la fermentación ruminal, así como el estudio del metabolismo nitrogenado en el rumen (Erfle *et al.*, 1977; Cotta y Russell, 1982; Chester-Jones *et al.*, 1990; Calsamiglia *et al.*, 1995; Griswold *et al.*, 1996; Bach *et al.*, 1999; Devant *et al.*, 2001; Griswold *et al.*, 2003; Bach *et al.*, 2008).
- Efecto del tipo de carbohidratos y de las interacciones carbohidratos – proteína sobre la fermentación ruminal (Chester-Jones *et al.*, 1991; Bach *et al.*, 1999; Rodríguez-Prado *et al.*, 2004; Hoover *et al.*, 2006; Rotger *et al.*, 2006).
- Metabolismo de los ácidos grasos y de su biohidrogenación en el rumen (Fellner *et al.*, 1995; Loor *et al.*, 2003, Qiu *et al.*, 2004; AbuGhazaleh *et al.*, 2005; Lourenço *et al.*, 2008).
- Efecto del pH y de sus oscilaciones sobre la fermentación ruminal (Erfle *et al.*, 1982; de Veth y Kolver, 2001; Calsamiglia *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002; Wales *et al.*, 2004; Calsamiglia *et al.*, 2008).
- Efectos de diferentes tasas de dilución de sólidos y líquidos sobre el mantenimiento de los protozoos (Hoover *et al.*, 1976; Crawford *et al.*, 1980; Hoover *et al.*, 1984).
- Efectos de distintos compuestos naturales (aceites esenciales, extractos vegetales, levaduras, antioxidantes, etc.) sobre la fermentación ruminal (Dawson *et al.*, 1990; Broudiscou *et al.*, 2000; Cardozo *et al.*, 2004, Castillejos *et al.*, 2005; Busquet *et al.*, 2005).

- Estudio de los cambios de las especies microbianas, mediados por diferentes condiciones (pH, ionóforos, etc.), y de las interacciones entre distintas especies microbianas (Russell *et al.*, 1981; Shi y Weimer, 1992; Thran *et al.*, 2003).
- Efecto de la adición de diferentes enzimas a la dieta sobre la fermentación ruminal (Kung *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2002; Colombatto *et al.*, 2007).
- Evaluación de subproductos agrícolas como alimentos para rumiantes (Durand *et al.*, 1988; Mansfield *et al.*, 1994; Martín-García *et al.*, 2006; Soder *et al.*, 2007).

Los diferentes estudios (Slyter and 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; Muetzel *et al.*, 2009), que han permitido comparar los parámetros observados en el rumen con los obtenidos en fermentadores, han puesto de manifiesto su potencial para simular buena parte de los parámetros de la fermentación ruminal. Detectar los factores, inherentes a los sistemas de simulación, que impiden reproducir adecuadamente la función ruminal tiene un gran interés para su validación. Las discrepancias entre sistemas de simulación y rumen parecen deberse a la imposibilidad o limitación para simular correctamente la multitud de factores que caracterizan un ecosistema tan complejo como el del rumen. A pesar de que pueden ser muchos los factores ambientales involucrados, la mayoría de los autores que han hallado diferencias *in vivo* e *in vitro* (Yang *et al.*, 2004; Carro *et al.*, 2009), coinciden en atribuir tales discrepancias a un reducido grupo de factores ambientales, reproducidos inadecuadamente, entre los que se encuentran los siguientes:

- **pH y su evolución** (Mansfield *et al.*, 1995; Ziemer *et al.*, 2000; Carro *et al.*, 2009). Resulta paradójico que a pesar de que se reconozca la importancia de este parámetro existan pocos estudios (Devant *et al.*, 2001; Colombatto *et al.*, 2003; Wales *et al.*, 2004, 2009) que hayan reproducido *in vitro* la evolución de los valores de pH en el rumen de animales alimentados con dietas similares. En ocasiones se utilizan



equipos automáticos que controlan y mantienen el pH en valores programados, mediante la adición de ácidos o bases débiles (Calsamiglia *et al.*, 2002). La relación encontrada entre el valor medio del pH (Russell y Dombrowski, 1980; Erfle *et al.*, 1982; de Veth y Kolver, 2001; Yang *et al.*, 2002), su fluctuación (Calsamiglia *et al.*, 2002) o el tiempo que se mantiene por debajo de cierto valor (Cerrato-Sánchez *et al.*, 2007b) y la actividad fermentativa de la microbiota justifica su gran influencia en la simulación de la fermentación ruminal. A pesar de que se trata de un parámetro susceptible de ser controlado no suele realizarse ese control y su valor, en el vaso del fermentador, está muy condicionado por otras variables, que se comentan a continuación, y que afectan a la simulación a través, fundamentalmente, del pH que promueven.

- **Tasa de dilución.** El tiempo de permanencia de las fracciones sólida y líquida en el vaso de fermentación es de enorme trascendencia a la hora de simular la fermentación ruminal *in vitro* (Abe y Kumeno, 1973; Crawford *et al.*, 1980; Meng *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2001). En los fermentadores de flujo continuo la tasa de renovación está determinada, principalmente, por el flujo de saliva infundida. Este parámetro permite una adecuada velocidad de evacuación de los ácidos producidos durante la fermentación y el mantenimiento de la fracción sólida en el vaso de fermentación durante el tiempo necesario para su correcta degradación (Hoover *et al.*, 1976). Una tasa de dilución adecuada permite también el mantenimiento de la población microbiana, asociada al contenido sólido del vaso de fermentación (Teather y Sauer, 1988). Se ha demostrado, en varios estudios con FFC, que la tasa de dilución influye notablemente en la fermentación ruminal, digestibilidad de los nutrientes, concentración de protozoos y eficiencias de crecimiento microbiano (Crawford *et al.*, 1980; Hoover *et al.*, 1984; Meng *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2001). La diferencia más notable entre los FFCS y los FFCD es la capacidad de estos últimos para establecer tasas de dilución distintas de la fase sólida y líquida del contenido del fermentador, a semejanza de lo que ocurre *in vivo*

(Hoover *et al.*, 1976). En FFCS se ha demostrado la existencia de una relación entre la velocidad de renovación del contenido del fermentador y el pH (Meng *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2001), lo que sugiere que las tasas de dilución afectan a la simulación ruminal, en parte a través del efecto del pH que promueven. También se reconoce un efecto directo de la tasa de dilución sobre la simulación de la fermentación ruminal (Hoover *et al.*, 1984), que estaría relacionado con el mantenimiento de la comunidad microbiana. Una especie microbiana concreta podrá sobrevivir y mantenerse en los sistemas de cultivo continuo si su tasa de crecimiento es mayor que la tasa de renovación del medio (Theodorou y France, 1993).

- **Estratificación del contenido del vaso de fermentación.** Otro aspecto importante y relacionado con las tasas de dilución, es la posibilidad de simular la estratificación que existe en el contenido ruminal de forma que las tasas de dilución de las fases sólida y líquida sean adecuadas sin recurrir a sacos permeables (Czerkawski y Breckenridge, 1977) o a un doble flujo por filtración (Hoover *et al.*, 1976). Sin embargo, pocos autores han conseguido reproducir bien este aspecto (Teather and Sauer, 1988; Fuchigami 1989; Muetzel *et al.*, 2009), mediante agitación intermitente o lenta del contenido del fermentador, o con dispositivos especiales situados a la salida del efluente que discrimine la evacuación de productos en función de su densidad, utilizando en ambos casos un bajo aporte de dieta que impida alcanzar valores ácidos de pH.
- **Producción de saliva.** En el rumiante la producción de saliva es tanto más elevada cuanto mayor es el contenido en carbohidratos estructurales de la ración. Son escasos los estudios que se han realizado con sistemas de flujo continuo (Colombatto *et al.*, 2003; Carro *et al.*, 2009), en los que se haya simulado un efecto tampón diferencial en función de la calidad de la dieta estudiada (forraje – concentrado), mediante cambios en la composición o concentración de sales de la saliva artificial utilizada. Por otra parte, la relación entre el volumen de

saliva infundido y la cantidad de dieta administrada parece de suma importancia ya que repercute en dos factores claves de la simulación como son el pH y las tasas de dilución. La relación saliva/dieta ha sido considerada, en algunos trabajos, como la causa de una inadecuada simulación de ciertos parámetros de la fermentación ruminal (Carro *et al.*, 2009).

- **Absorción de los productos volátiles de la fermentación.** Con la excepción de algún trabajo (Abe y Kumeno, 1973) una de las limitaciones físicas de los sistemas de simulación *in vitro*, para reproducir el ambiente ruminal, es la falta de absorción de los productos volátiles generados durante la fermentación. Por ello numerosos autores han encontrado concentraciones diferentes de estos productos de la fermentación en los FFC y en el rumen (Mansfield *et al.*, 1995; Devant *et al.*, 2001). El acúmulo de productos ácidos de la fermentación provoca descensos del pH, si la tasa de dilución de la fase líquida no se modifica, e incrementos de la presión osmótica, factores que pueden aumentar los requerimientos energéticos de la población microbiana (Mansfield *et al.*, 1995).

Otros factores, menos mencionados pero igualmente determinantes, en la simulación de la fermentación ruminal son los siguientes:

- **Reciclado de la urea y aporte endógeno de proteína.** Muchos de los trabajos llevados a cabo con FFC (Meng *et al.*, 1999; Tapia *et al.*, 2002; Moumen *et al.*, 2008) no tienen en cuenta ni el aporte endógeno de N, a través del reciclado de urea, ni el componente endógeno de la proteína que existe *in vivo*, y han atribuido las diferencias encontradas en algunos parámetros del metabolismo nitrogenado a la ausencia de esos factores (Mansfield *et al.*, 1995; Rotger *et al.*, 2006). Otros, sin embargo, si lo han incorporado en estudios de simulación, pero han advertido que las cantidades infundidas no han sido las idóneas para reproducir adecuadamente los parámetros del metabolismo nitrogenado (Hannah *et al.*, 1986).

- **Falta de representatividad de las comunidades microbianas en el inóculo.** Algunos autores (Ziemer *et al.*, 2000) han demostrado que la población microbiana del inóculo empleado en los fermentadores, difiere de la del contenido del rumen, a partir del que se obtiene. Estas diferencias parecen deberse, fundamentalmente, a la ausencia de buena parte de las bacterias firmemente adheridas a las partículas de alimento, retenidas durante el filtrado del contenido ruminal. En ocasiones el contenido ruminal se homogeneiza antes de filtrar o se realiza un segundo filtrado, después de resuspender el residuo del primero con solución tampón, para tratar de obtener una mayor proporción de bacterias asociadas a sólidos (Colombatto *et al.*, 2003; Griswold *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2004). Otra posibilidad al respecto es la recogida de muestra, cuyas comunidades microbianas no representen la población total de los diferentes nichos ecológicos que existen en el ambiente ruminal (Sadet *et al.*, 2007).

Los factores ambientales, incorrectamente reproducidos en los fermentadores, que limitan la simulación de las condiciones *in vivo* actúan a través del efecto que ejercen sobre las comunidades microbianas, últimas responsables de la fermentación en el rumen. La capacidad de simulación de los sistemas *in vitro* puede evaluarse mediante el estudio de los parámetros de la fermentación ruminal (Hannah *et al.*, 1986), de las comunidades microbianas presentes (Slyter y Putnam, 1967), o de ambos (Ziemer *et al.*, 2000). Pocos trabajos han comparado las comunidades microbianas establecidas en fermentadores con las del rumen (Slyter y Putnam, 1967; Mansfield *et al.*, 1995; Ziemer *et al.*, 2000; Muetzel *et al.*, 2009), pero sugieren la existencia de ligeras diferencias entre ambos ambientes, en relación a algunos grupos microbianos. Numerosos trabajos realizados con FFC muestran que el cambio más importante que experimenta la microbiota se debe a la pérdida de protozoos (Hoover *et al.*, 1976; Hannah *et al.*, 1986; Yang *et al.*, 2004), que explicaría algunas discrepancias *in vivo* - *in vitro*, en relación a la fermentación ruminal (Slyter y Putnam, 1967; Mansfield *et al.*, 1995; Bach *et al.*, 1999). Diferencias similares se han observado entre

animales faunados y defaunados (Ushida *et al.*, 1986; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2007), asociándose bien al metabolismo característico de protozoos (Jouany *et al.*, 1988) o bien a la modificación de la comunidad bacteriana que su ausencia entraña (Ozutsumi *et al.*, 2005; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2007). Entre los estudios de comparación directa rumen – FFC, en relación a las comunidades microbianas existentes, destacan los trabajos de Mansfield *et al.*, (1995), que utilizaron técnicas de cultivo, y de Ziemer *et al.*, (2000), que trabajaron con técnicas moleculares. Los primeros concluyeron que los FFCD son capaces de mantener tanto las bacterias amilolíticas y proteolíticas como los hongos, en número similar al del rumen, aunque también se observaron menores concentraciones de bacterias celulolíticas y de protozoos. El efecto de lavado de aquellos microorganismos que presentan tiempos de generación altos, como protozoos y bacterias celulolíticas, se atribuyó en este estudio a las tasas de renovación empleadas junto a la ausencia, en el fermentador, de zonas en las que pudiera producirse una retención. Ziemer *et al.*, (2000), con sondas del ARNr 16SS específicas de grupos microbianos, observaron una similitud de la biomasa microbiana de fermentadores y del rumen. Sin embargo, estos autores también señalaron la existencia de diferencias importantes entre el rumen y los fermentadores en la estructura de las arqueas y de bacterias del grupo Fibrobacter, así como en el número de protozoos. A pesar de estas diferencias, los autores indicaron que los FFCD mantenían comunidades microbianas funcionalmente similares a las del rumen.

Por último, cabe destacar que prácticamente todos los trabajos (Slyter and Putnam, 1967; Hannah *et al.*, 1986; Mansfield *et al.*, 1995; Gizzi *et al.*, 1998; Ziemer *et al.*, 2000; Devant *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004; Rotger *et al.*, 2006; Moumen *et al.*, 2008; Carro *et al.*, 2009; Muetzel *et al.*, 2009), que han permitido realizar una comparación directa entre sistemas de simulación *in vitro* y el rumen de animales alimentados con las mismas dietas, han obtenido resultados que indican que, en términos generales, los sistemas *in vitro* son herramientas útiles en el estudio de la fermentación ruminal. Además, algunos de estos autores han apuntado que si bien existen algunas diferencias *in vivo* – *in vitro*, en términos numéricos (Muetzel *et al.*, 2009), la simulación de los efectos estudiados es adecuada (Carro *et al.*, 2009), obteniéndose una ordenación de los tratamientos similar a la que se produce *in vivo* (Devant *et*

*al.*, 2001). En este sentido, Czerkawski y Bredenricke (1977) ya apuntaban la utilidad de los sistemas de simulación *in vitro* para realizar comparaciones entre tratamientos, dentro de un mismo experimento, probablemente asumiendo que los factores ambientales no reproducidos adecuadamente *in vitro* afectaban de igual forma a la fermentación ruminal de las dietas ensayadas. Sin embargo, algunos de los estudios de comparación directa que han ensayado dietas de diferente calidad (Hannah *et al.*, 1986; Mansfield *et al.*, 1995) apuntan a que la simulación está influida por la calidad de la dieta. Así Mansfield *et al.* (1995) encontraron, en FFCD, un grado de simulación de la fermentación ruminal diferente en función del contenido en carbohidratos estructurales de la ración, lo que subraya la necesidad de validar los FFCS con dietas de calidad variable, y reconocer los factores dietéticos responsables de una mejor o peor simulación. Por otro lado, las diferencias existentes entre los diferentes sistemas de simulación, fundamentalmente FFCS, FFCD y Rusitec, encontradas por algunos autores (Dahlberg *et al.*, 1988; Carro *et al.*, 2009), junto con las diferencias constatadas a nivel de la fermentación ruminal entre diferentes especies de rumiantes (Prigge *et al.*, 1984; Reid *et al.*, 1990), indican que los resultados obtenidos con un tipo de fermentador y especie animal no deberían ser extrapolados a otras circunstancias.

#### **2.4. Estudio del ecosistema ruminal**

El ecosistema ruminal, caracterizado por la gran diversidad y densidad de microorganismos que alberga, es uno de los sistemas gastrointestinales mejor estudiados (Hespell *et al.*, 1997; Hobson y Stewart, 1997) y ha sido objeto de un intenso estudio en los últimos 50 años (Simpson *et al.*, 2002). Los microorganismos del rumen interactúan entre sí, con el alimento y con el animal hospedador, representando, por tanto, una microbiota simbiótica compleja, con estructura y composición muy particulares (Krause y Russell, 1996). Esta microbiota es altamente dinámica e influenciada por una gran variedad de factores bióticos y abióticos tales como aditivos de los alimentos, estatus fisiológico del hospedador, localización geográfica, estación y régimen alimenticio (Stewart *et al.*, 1997). Tradicionalmente su estudio se ha llevado a cabo mediante la caracterización fenotípica (morfología, motilidad, sustratos

degradados y productos resultantes), utilizando métodos clásicos de cultivos anaerobios selectivos (Hungate, 1966; Dehority *et al.*, 1989; Hobson y Stewart *et al.*, 1997). Las limitaciones impuestas por los métodos tradicionales de cultivo para el estudio de la microbiota digestiva han sido mencionadas por numerosos autores y radican, fundamentalmente, en el desconocimiento de los factores de crecimiento y condiciones ambientales que requieren la mayor parte de los microorganismos del tracto digestivo. Tal es así, que se ha estimado que sólo el 10 - 15 % del total de bacterias ruminales son cultivables (Hespell *et al.*, 1997). Además, actualmente se acepta que el mejor esquema de clasificación taxonómica debe reflejar las relaciones evolutivas naturales que existen entre organismos, y una clasificación basada únicamente en parámetros fenotípicos no es suficiente para alcanzar dicho objetivo (Raskin *et al.*, 1997). A esas desventajas se une el hecho de que la composición de las poblaciones, presentes en un ecosistema tan complejo como el del rumen, se reestructura una vez se extrae de su ambiente original, obteniéndose una representación inexacta de la comunidad microbiana original (Amann *et al.*, 1995), entendiéndose como comunidad el conjunto de especies que coexisten en un lugar y tiempo determinados (Begon *et al.*, 1986). La secuenciación de los ácidos nucleicos de los microorganismos es el método más preciso para su clasificación (Olsen *et al.*, 1986). Los métodos moleculares, independientes del cultivo de microorganismos, han permitido, en los últimos años, reunir una valiosa información sobre la complejidad de las comunidades microbianas presentes en muchos ecosistemas, incluido el ruminal. Los avances en las técnicas moleculares han puesto de manifiesto que los métodos basados en cultivos de microorganismos excluían aproximadamente un 99% de los microorganismos presentes en los ecosistemas (Amann *et al.*, 1995) y que de los 52 filae identificados en la actualidad, la mitad se conocen gracias a las secuenciación de clones (Rappe y Giovannoni, 2003). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la base de la mayor parte de las técnicas independientes de cultivos e implica la amplificación de genes diana utilizando oligonucleótidos iniciadores o cebadores (primers), diseñados para unirse tanto a secuencias específicas como a aquellas que abarcan un amplio rango de especies microbianas, y permite examinar directamente la diversidad y la

estructura de las comunidades del rumen en su totalidad en función de su genotipo y no del fenotipo.

#### **2.4.1. Técnicas moleculares basadas en el gen ARNr 16S**

Los ácidos nucleicos, macromoléculas comunes a todos los seres vivos, cambian con el tiempo, considerándose como documentos de la historia evolutiva de los mismos (Zuckerlandl y Pauling, 1965). Asumiendo que los cambios se producen al azar y que aumentan con el tiempo de manera lineal, las diferencias en la secuencia de nucleótidos presentes en dos organismos distintos, reflejan la distancia evolutiva existente entre ellos. Esta idea, introducida por Zuckerlandl y Pauling (1965), se ha utilizado durante décadas para establecer las relaciones filogenéticas entre los seres vivos, creando un marco apropiado para su clasificación e identificación. El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. Su aplicación, como cronómetro molecular, fue propuesta por Carl Woese a principios de la década de los 70 (Olsen y Woese, 1993). Desde entonces, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas de los organismos procariotas, causando un profundo impacto en la visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana.

El ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación, expresado en unidades Svedberg, de 70S y puede disociarse en dos subunidades, una grande (50S) y otra pequeña (30S) o SSU (Small SubUnit). Cada subunidad es un complejo ribonucleoproteico, constituido por proteínas ribosómicas y moléculas de ARNr específicas. La subunidad 30S (SSU) contiene el ARNr 16S y 21 proteínas diferentes, mientras que la subunidad 50S contiene los ARNr 5S y 23S junto con unas 34 proteínas. El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 pb, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. El análisis de la secuencia de los ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos reveló un hecho adicional de gran importancia práctica: la presencia de una o más secuencias características, que se denominan oligonucleótidos firma (Woese *et al.*, 1987). Se trata de secuencias específicas cortas, que aparecen en

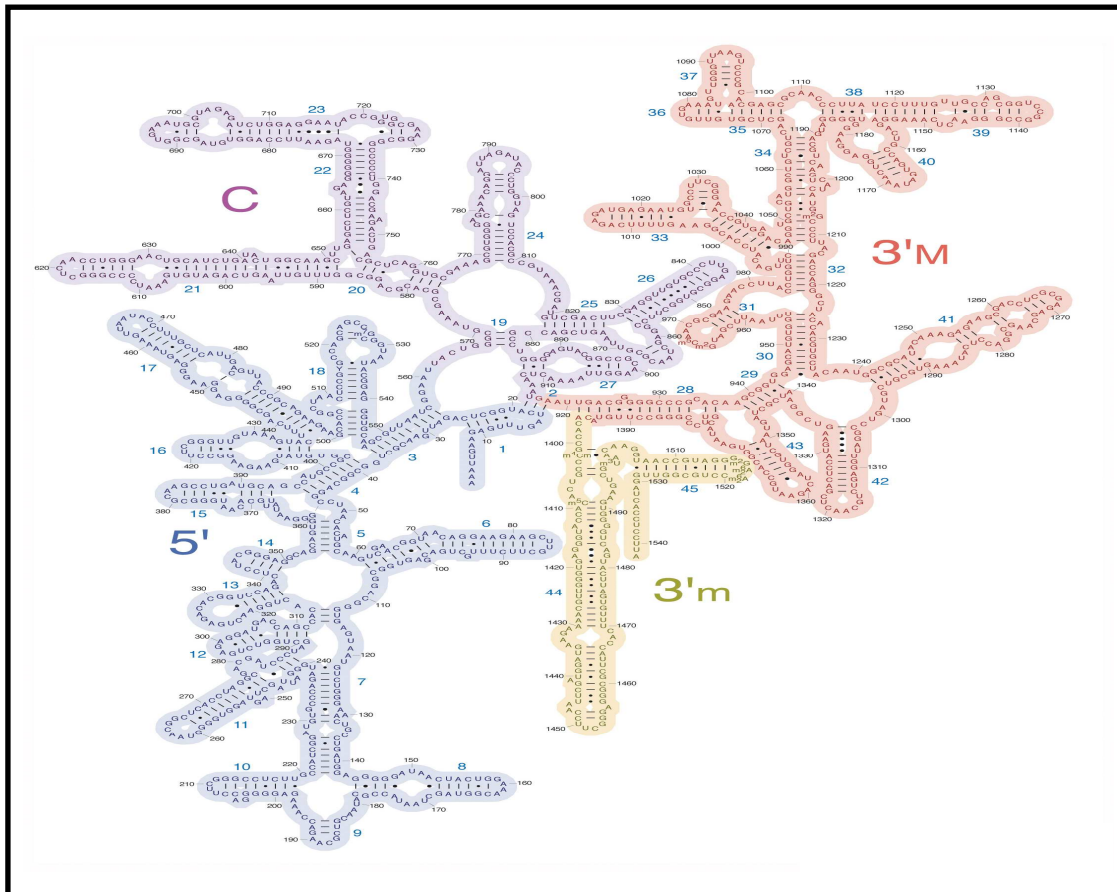


todos o en la mayor parte de los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca, o raramente, están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo.

Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al ARNr 16S (**Figura 2.6**), hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarlo. De hecho, esta macromolécula presenta una serie de características, en base a las cuales fue considerado por Woese (1987) como cronómetro molecular definitivo:

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para la identificación bacteriana.
2. Posee regiones altamente conservadas a lo largo de la historia junto con regiones de secuencia variable. Gracias a las tasas de evolución, diferentes en cada tipo de región, se pueden establecer relaciones en diferentes niveles jerárquicos, mediante un análisis comparativo de secuencias.
3. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta como para aportar información acerca de todos los procariotas y, sin embargo, posee suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
4. El tamaño del fragmento entero del ARNr 16S (1.500 pb) es ideal, tanto para una adecuada amplificación y secuenciación como para minimizar las fluctuaciones estadísticas que se produzcan en la secuencia. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ADNr 16S, existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los ADNr 16S de dos bacterias el que indique su relación evolutiva. Además, el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos, que reflejan la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición relativa en el contexto de los organismos comparados.



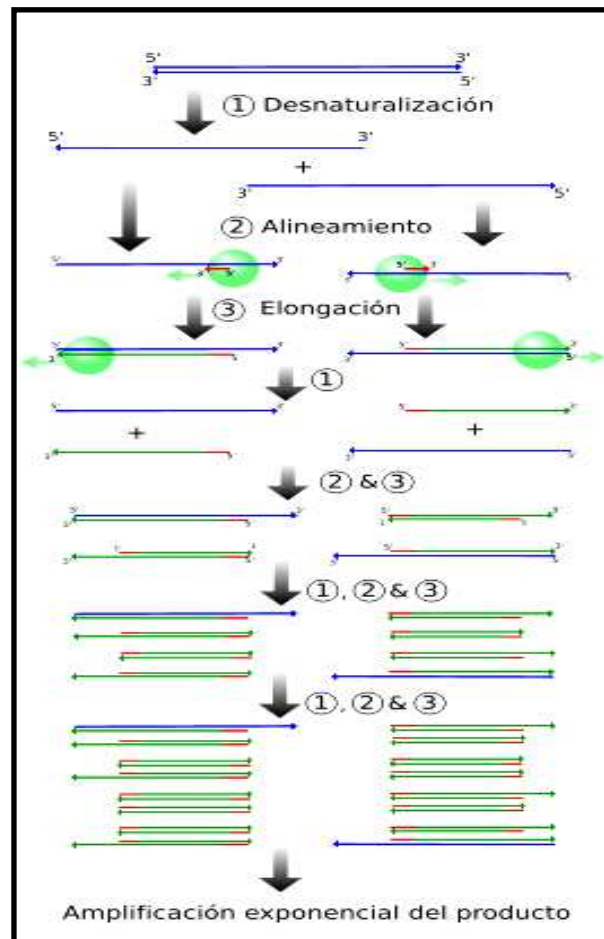
**Figura 2.6.** Secuencia completa del gen que codifica el ARNr 16S en *Escherichia coli*

Varios estudios han demostrado que más del 90% de los microorganismos, que se observan mediante microscopía in situ, pueden extraerse y analizarse utilizando, como marcador bacteriano, el gen que codifica el ARNr 16S (Steffan y Atlas, 1991), en comparación con los que pueden ser cultivados, que representan menos del 0,1% (Hill *et al.*, 2000).

#### **2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Esta técnica (Mullis, 1989) ha revolucionado la detección de ADN, al permitir obtener un gran número de copias de la secuencia de interés a partir de tan solo, en teoría, una copia de dicho molde. Se trata del primer paso para el estudio de las comunidades microbianas presentes en el ecosistema que se pretende estudiar. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de la enzima ADN polimerasa para replicar hebras de ADN. La longitud del fragmento multiplicado o amplicón está definida por los límites impuestos por

los oligonucleótidos cebadores específicos, que permiten a la ADN polimerasa iniciar la síntesis de una nueva cadena de ADN. La mezcla, preparada *in vitro*, que contiene la muestras con el material genético a amplificar además de los substratos y la enzima de la reacción, se somete a una serie de ciclos sucesivos de temperaturas, cada uno de los cuales permite duplicar el número de copias de ADN (Rasmussen, 2001). En la **Figura 2.7** se muestra un esquema ilustrativo de los ciclos que forman parte de esta reacción, que incluye una fase de desnaturalización, otra de alineamiento y una última de elongación. Aunque se trata de una técnica extremadamente útil, la PCR presenta ciertas limitaciones tales como la inhibición de la amplificación, amplificación diferencial y formación de artefactos como las quimeras.



**Figura 2.7.** Esquema representativo de los ciclos que transcurren en una reacción de PCR clásica

### **2.4.3. Librería de clones**

El producto de la PCR puede clonarse en plásmidos vectores e introducirse en células bacterianas competentes para la clonación de las diferentes secuencias presentes en la muestra problema. Se pueden establecer las secuencias de los segmentos clonados y comparar con secuencias depositadas en bases de datos públicas, tales como Entrez del NCBI o el proyecto de base de datos ribosómica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El resultado de esta comparación se expresa en forma de árboles filogenéticos (Cole *et al.*, 2003), considerándose que aquellas secuencias que comparten más de un 97,5% de similitud tienen una alta probabilidad de pertenecer a la misma especie, aunque no existe un porcentaje de similitud estandarizado para delimitar el género. En general, los microorganismos se agrupan en unidades taxonómicas operacionales, que representan grupos de especies que, aunque pueden diferir en más de un 30% de su genoma (Rosselló-Mora y Amann, 2001), presentan una elevada similitud en la secuencia del ARNr 16S (Gevers *et al.*, 2005).

Se han realizado librerías para determinar la diversidad de la microbiota del tracto gastrointestinal de diversos animales, entre ellos los rumiantes. Whitford *et al.* (1998) fueron los primeros en emplear esta técnica para estudiar los microorganismos presentes en el rumen. Para ello, se extrajo ADN de muestras del rumen de vacuno lechero, se amplificó el gen de ARNr 16S, se clonaron los amplicones resultantes y se analizaron sus secuencias. La mayoría de las secuencias de ADNr obtenidas correspondieron a 20 nuevas especies bacterianas, que no habían sido previamente aisladas ni cultivadas. Estas técnicas han permitido aclarar y examinar cuestiones clásicas de la nutrición de rumiantes, como por ejemplo, que las fases líquida o sólida del rumen (Tajima *et al.*, 1999) y las variaciones en la dieta (Tajima *et al.*, 2000) afectan notablemente la composición bacteriana del rumen; que la comunidad bacteriana asociada a las partículas fibrosas del contenido del rumen no solo incluye especies fibrolíticas sino también especies no fibrolíticas y, por tanto, la degradación de la fibra en el rumen podría acelerarse por la interacción entre estos dos grupos de bacterias (Koike *et al.*, 2003); que la presencia de protozoos afecta significativamente a la composición bacteriana del rumen (Ozutsumi *et al.*, 2005); tanto en ganado vacuno (Whitford *et al.*, 1998; Tajima

*et al.*, 1999; 2000), como en ovino (Koike *et al.*, 2003), el ecosistema ruminal parece estar dominado por bacterias gram positivas, con bajo contenido en G + C, particularmente por especies relacionadas con el género *Clostridium*. Esta aparente predominancia podría deberse, en parte, a la amplificación selectiva durante el proceso de PCR de grupos con bajo contenido en G + C (Wintzingerode *et al.*, 1997).

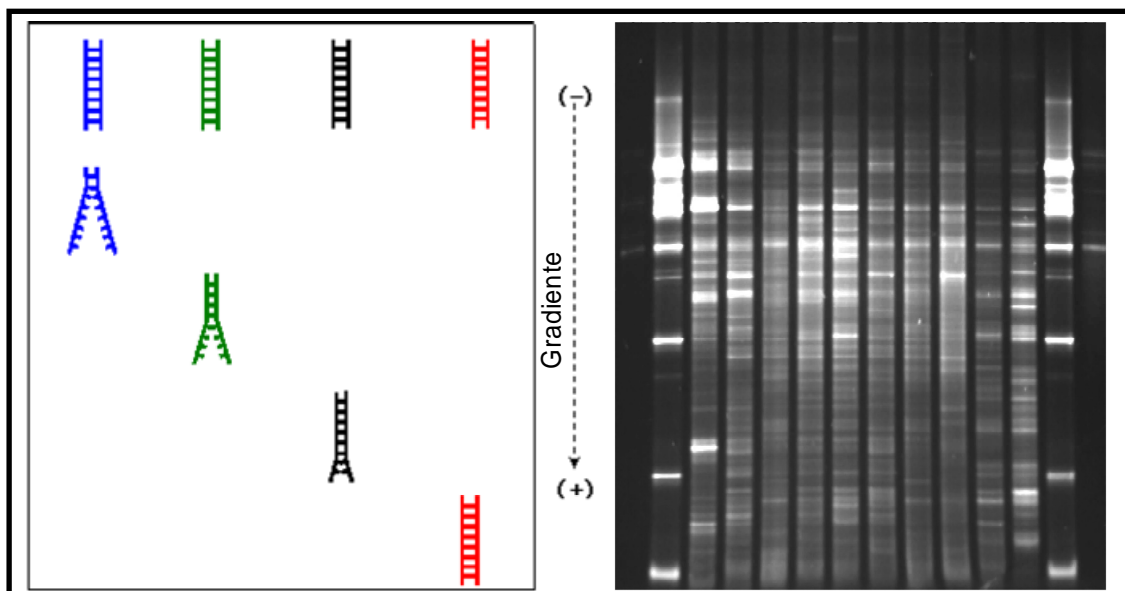
#### **2.4.4. Técnicas de caracterización microbiana o “fingerprinting”**

Los métodos tradicionales de identificación de microorganismos, mediante técnicas de cultivo y microscopía, son tediosos y consumen mucho tiempo. Un método mas rápido y eficaz para la identificación de microorganismos implica la secuenciación de sus genes ribosómicos, como se ha comentado anteriormente, habiéndose convertido en la forma mas aceptada en el entorno científico. Con el objetivo de analizar comunidades complejas de microorganismos no cultivables, muchos investigadores optan por la creación de librerías de clones del gen ribosomal 16S. Sin embargo, dichas técnicas, aunque enormemente precisas, tienen un alto coste económico y de tiempo, incompatible muchas veces con el análisis rápido de ecosistemas muy complejos como el del rumen, que cambian rápidamente en función de múltiples variables como, por ejemplo, la dieta. Las técnicas moleculares de caracterización ó “fingerprinting” se utilizan en la actualidad para un análisis rápido de la dinámica y estructura de poblaciones microbianas complejas, en gran cantidad de muestras. Estas técnicas están basadas en la existencia de polimorfismos en el gen que codifica el ARNr 16S de los distintos grupos de bacterias, lo cual proporciona un patrón o perfil específico para cada comunidad microbiana dependiendo del tipo de bacterias que la integren. Por tanto, estas técnicas permiten discriminar en mayor o menor grado los productos de la PCR de la misma longitud pero que difieren en su secuencia.

##### **2.4.4.1 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante/temperatura (DGGE/TGGE)**

Ambas técnicas electroforéticas permiten la separación de los fragmentos amplificados de ADN en función de su secuencia. La desnaturalización, por gradiente químico (DGGE) o físico (TGGE), de los

amplicones del gen de la subunidad 16S ribosomal responde a la mayor o menor integridad/estabilidad de su estructura frente a los agentes desnaturizantes, que depende en último término, de la fuerza de los enlaces que se establezcan en la secuencia específica de nucleótidos (**Figura 2.8**). La amplificación suele realizarse con oligonucleótidos universales, de bacterias (Nubel *et al.*, 1996) o de protozoos (Regensbogenova *et al.*, 2004), aunque también es posible utilizar cebadores específicos de grupos taxonómicos concretos para mejorar la sensibilidad y evitar la interferencia de otros microorganismos (Heuer *et al.*, 1997). La resolución de estas técnicas puede incrementarse mediante la incorporación de un dominio de alta estabilidad (cola de GC o clamp; Yasuda y Shiaris, 2005) en uno de los extremos del fragmento amplificado (Muyzer y Ramsing, 1995).



**Figura 2.8.** Electroforesis en gel con gradiente desnaturante o de temperatura

El gradiente químico o de temperatura se establece a lo largo del gel de poliacrilamida, en paralelo al campo eléctrico. Las muestras de ADN migran a través de este gradiente desde una temperatura baja hasta otra alta o, desde un porcentaje del agente químico desnaturante bajo hasta uno alto. En el punto del gel en el que existe una separación parcial de las dos hebras de ADN, la migración del fragmento comienza a disminuir drásticamente y se

separan secuencias del mismo tamaño pero de diferente estabilidad química o térmica.

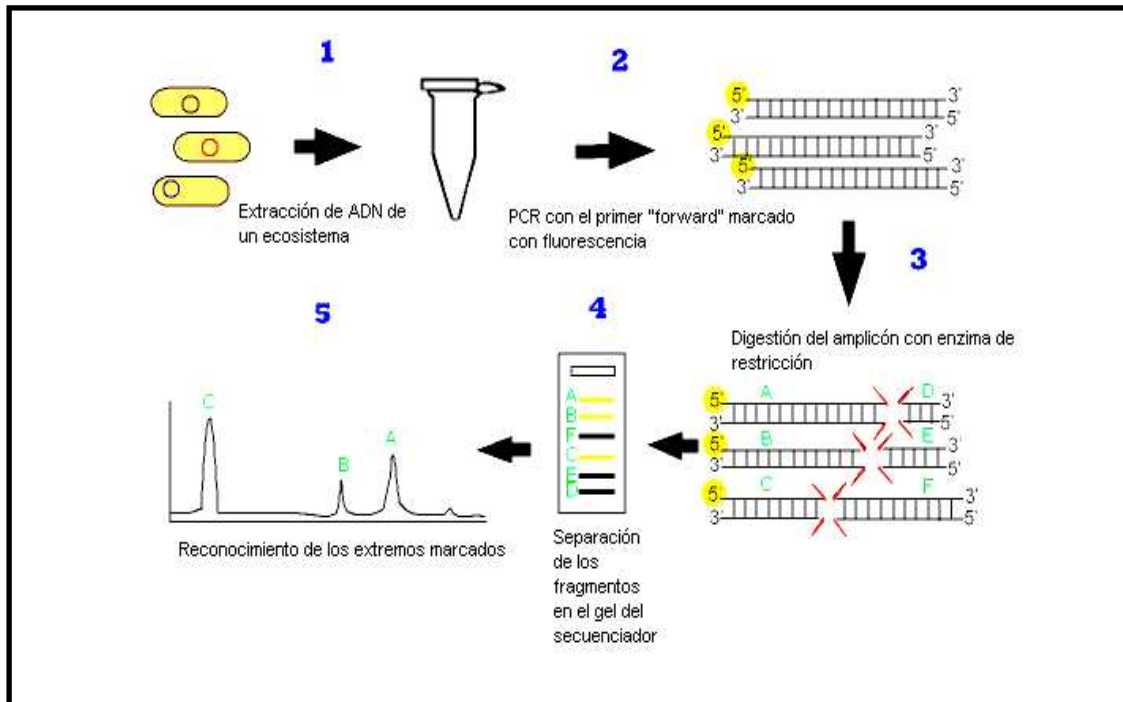
La separación se basa, por tanto, en la desnaturalización diferencial de los fragmentos de ADN. Las variaciones de la secuencia hacen que la integridad de la doble hebra difiera frente a estímulos desnaturalizantes, y las moléculas con secuencias diferentes paren de migrar en posiciones diferentes del gel (Muyzer y Smalla, 1998). Las distintas bandas resultantes se visualizan mediante la tinción del gel (bromuro de etidio, tinción de plata ó SYBR Green I). El patrón de bandas es indicativo del número de especies presentes en la muestras y, por tanto, permite la visualización de la diversidad genética de las poblaciones microbianas (Simpson *et al.*, 1999). La identificación posterior, de grupos de bacterias o de especies concretas, puede llevarse a cabo mediante la clonación y secuenciación de las bandas escindidas del gel, o mediante hibridación del perfil utilizando sondas filogenéticas (Muyzer y Smalla, 1998). Ambas técnicas son sencillas y no requieren elevadas inversiones, por lo que son ampliamente utilizadas en el estudio y caracterización de ecosistemas microbianos complejos, y ha sido utilizada con éxito en estudios llevados a cabo en el ecosistema del rumen en relación al efecto de numerosos factores sobre las poblaciones microbianas del rumen: empleo de antibióticos (Edwards *et al.*, 2005), de la ausencia/presencia de protozoos (Yáñez-Ruíz *et al.*, 2006), variabilidad individual dentro de un mismo rebaño (Regensbogenova *et al.*, 2004), el patrón de colonización de material vegetal en el rumen (Edwards *et al.*, 2007) o de aceites vegetales (Kim *et al.*, 2008). No obstante, varios autores (Muyzer *et al.*, 1993; Zoetendal *et al.*, 1998) consideran que estas técnicas poseen una escasa sensibilidad dado que sólo se detectan las especies bacterianas dominantes, que suelen constituir menos del 1% del total de la comunidad. Por otro lado, se ha observado que los fragmentos de ADN pertenecientes a especies con alta homología pueden generar una misma banda (Buchholz-Cleven *et al.*, 1997) o varias diferentes (Jackson *et al.*, 2001), mientras que poblaciones muy distintas pueden migrar conjuntamente hasta la misma posición (Vallaeyts *et al.*, 1997), especialmente cuando se trata de comunidades complejas (Ben Omar y Ampe, 2000) como las del rumen.

#### **2.4.4.2. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP)**

Se trata de una técnica de gran utilidad para la comparación de comunidades microbianas en diferentes muestras (Kitts, 2001), al analizar el polimorfismo de los genes amplificados del ARNr 16S. La T-RFLP (Liu *et al.*, 1997) se ha propuesto como una técnica bastante reproducible, que permite una mejor identificación e interpretación de resultados con respecto a su antecesora: RFLP ó ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) y se considera una de las técnicas “fingerprinting” más utilizadas por su alto rendimiento (Schütte *et al.*, 2008). A diferencia de la técnica ARDRA, que genera multitud de fragmentos de ADN de tamaño variable tras una digestión con enzimas de restricción (Massol-Deya *et al.*, 1995) la T-RFLP permite simplificar el análisis al reducir y centrar el estudio de la variabilidad únicamente al fragmento de ADN terminal que se encuentra marcado, lo que la convierte en uno de los instrumentos más poderosos en el campo de la ecología microbiana para comparar rápidamente la diversidad de secuencias de ADN bacteriano procedente de muestras ambientales (Marsh, 1999).

El perfil microbiano se obtiene por T-RFLP en una serie de pasos (**Figura 2.9**) que combinan PCR, digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel. El ADN, extraído de la muestra problema, es amplificado por PCR utilizando cebadores u oligonucleótidos homólogos de regiones conservadas del gen diana, por lo general el gen ARNr 16S. Uno de estos cebadores se encuentra marcado en su extremo 5', generalmente con una molécula fluorescente. Los amplicones generados por PCR se digieren con enzimas de restricción, generalmente con secuencias de reconocimiento tetraméricas. Los amplicones digeridos se someten a una electroforesis, bien en gel de poliacrilamida bien en un secuenciador automático de ADN con detector de fluorescencia, de forma que solo los fragmentos de restricción terminales (que son los únicos marcados con fluorescencia) son visualizados. Tras la electroforesis, el tamaño de cada fragmento (FRT) de restricción terminal, en pares de bases, se calcula mediante un programa de análisis de los fragmentos, al comparar el tiempo de retención del pico correspondiente a un FRT con el tamaño del ADN correspondiente al estándar incorporado en la muestra.





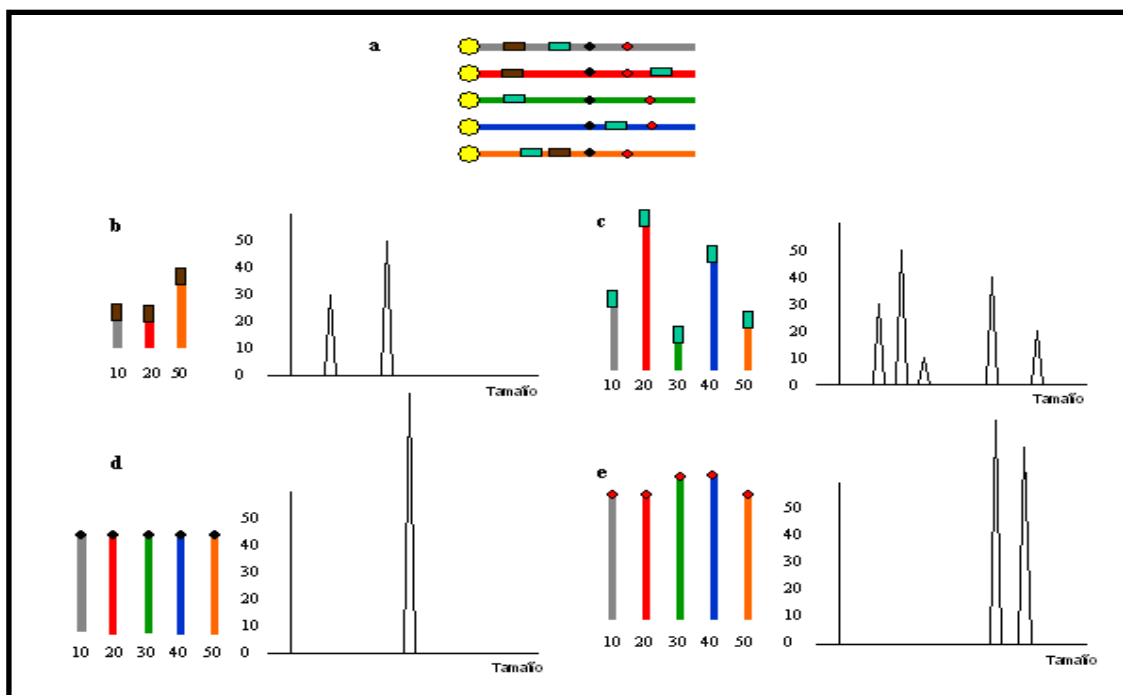
**Figura 2.9.** Obtención de los fragmentos terminales de restricción mediante T-RFLP

Este programa integra el electroferograma y devuelve la altura y área de cada pico. Debido a que las diferencias en el tamaño de los FRT reflejan diferencias en las secuencias de los genes ARNr 16S (polimorfismo de las secuencias), el perfil obtenido a partir de una muestra ("fingerprinting" o huella digital) refleja la diversidad y abundancia relativa de las especies bacterianas dominantes en la comunidad de estudio. A pesar de que se trata de una técnica susceptible de los errores propios de la PCR (Becker *et al.*, 2000; Acinas *et al.*, 2005) se ha demostrado que su aplicación proporciona un medio sencillo de evaluar los cambios temporales o espaciales en la estructura de la comunidad microbiana estudiada, al monitorizar en el perfil obtenido la ganancia o pérdida de fragmentos específicos en relación a otros (Franklin y Mills, 2003).

Cuando esta técnica se complementa con la construcción de librerías de clones del ARNr 16S y su secuenciación, se puede obtener una valiosa información sobre la composición de la comunidad microbiana estudiada. Esta técnica "fingerprinting" está altamente influenciada por la elección de los oligonucleótidos necesarios para la amplificación del fragmento de interés.

Esta elección puede ser crítica al limitar el número de copias de ADN diana y, por tanto, el perfil obtenido podría no ser representativo del ecosistema (Liu *et al.*, 1997; Marsh, 1999; Kaplan *et al.*, 2001). Es especialmente importante elegir cebadores universales cuando se pretende obtener una descripción general de un ecosistema dado.

La utilización de varias enzimas de restricción permite multiplicar la información filogenética proporcionada por la T-RFLP, puesto que cada enzima genera un patrón de picos diferente para una misma muestra (**Figura 2.10**).



**Figura 2.10.** Representación de los picos procedentes de diferentes fragmentos de restricción terminales al someter una misma muestra a diferentes enzimas de restricción. a) amplicones marcados con fluorescencia en un extremo (●), en los que se representan distintos sitios de reconocimiento de enzimas de restricción (■, □, ●, ●), a lo largo de su secuencia; b-e) fragmentos terminales de restricción tras la incubación individual con cada una de las enzimas de restricción y patrón de picos, obtenido por T-RFLP en un secuenciador. Los valores numéricos aluden a la abundancia relativa de cada fragmento y los perfiles muestran el tamaño de los fragmentos frente a su abundancia relativa

De esta forma, se consigue reducir, en el conjunto de perfiles, la probabilidad de que un pico agrupe a varias especies bacterianas, siendo los árboles filogenéticos resultantes más fiables. La T-RFLP es una de las técnicas fingerprinting más válidas para el estudio de la biodiversidad, y su relativa simplicidad ha hecho que se aplique a numerosos ecosistemas microbianos, tales como la microbiota del tracto digestivo humano (Engelbrektsen *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007), de cerdos (Molbak *et al.*, 2008), pollos (Gong *et al.*, 2002), ratas (Kaplan *et al.*, 2001) y muestras de distinta índole (Liu *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 1998; Dunbar *et al.*, 2000; Blackwood *et al.*, 2003). En rumiantes el uso de esta técnica ha sido más limitado, aunque ha permitido demostrar cómo el efecto de la dieta y los hábitos de alimentación sobre la microbiota ruminal (Belanche *et al.*, 2007). También ha permitido poner de manifiesto que la mayor diversidad bacteriana se registra en presencia de protozoos ruminales (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2007; Ozutsumi *et al.*, 2008).

La principal ventaja de esta técnica reside en que la utilización de un secuenciador automático permite obtener resultados reproducibles. Aunque el perfil genético no se reproduce completamente y algunos picos menores pueden desaparecer, el perfil general del electroferograma y las relaciones entre los picos principales son reproducibles. El uso de un secuenciador automático, que exporta los resultados en un formato numérico digital, también permite guardar los datos fácilmente y compararlos con los de otras muestras y experimentos. El formato numérico de los datos puede y ha sido utilizado para una cuantificación relativa y análisis estadístico. Aunque la secuenciación de los fragmentos no puede obtenerse del perfil de la T-RFLP, puede lograrse hasta cierto punto la asignación de los picos a secuencias existentes. El que solo los fragmentos terminales sean detectados puede hacer que dos secuencias distintas, que compartan el mismo sitio de restricción terminal aparezcan representadas en un mismo pico del electroferograma y sean indistinguibles una de la otra (Dunbar *et al.*, 2001; Engelbrektsen *et al.*, 2003; Blackwood *et al.*, 2007). Además, cuando la T-RFLP se aplica a una comunidad microbiana compleja el resultado es, frecuentemente, una agrupación de la diversidad total en un número de picos reducido (20-80) cada uno de los cuales represente a una serie de secuencias distintas. Aunque este

fenómeno hace que los resultados de la T-RFLP sean fáciles de manejar, introduce errores y subestima, de alguna forma, la diversidad real de la muestra. Los intentos para minimizar este problema implican el uso de varias enzimas de restricción y/o marcar ambos primers con fluoróforos distintos. Por otro lado, al igual que otras técnicas “fingerprinting”, la T-RFLP generalmente sólo caracteriza los organismos predominantes (< 1% de la comunidad), debido a los límites de detección que aparecen cuando se cuantifican simultáneamente múltiples marcadores. Por tanto, las especies minoritarias nunca pueden ser detectadas, aunque en la mayoría de los ecosistemas complejos como el rumen sean las que determinen la diversidad de la comunidad microbiana.

#### **2.4.4.2.1. Identificación de la composición microbiana por T-RFLP**

Existen varias herramientas web disponibles con las que poder identificar los componentes/miembros de las comunidades microbianas de las muestras problema, a partir de los datos generados mediante la técnica T-RFLP (Wise y Osborn, 2001; Kent *et al.*, 2003; Shyu *et al.* 2007; Junier *et al.*, 2008). El funcionamiento de los distintos programas de asignación (PAT, TRUFFLER, APLAUS+, FRAGSORT, TRiFLe) es similar. Se basan en la comparación del tamaño experimental de los fragmentos terminales de restricción (FTR), generados a partir de las muestras problema, con los tamaños teóricos de los FTR de grupos o especies concretas cuyas secuencias son conocidas para el gen diana estudiado (ADNr 16S). Existen recursos disponibles en la red (Ribosomal Database Project; <http://rdp.cme.msu.edu>; Microbial Community Analysis website, <http://hermes.campus.uidaho.edu>; European Molecular Biology Laboratory, <http://www.ebi.ac.uk/embl>), que permiten predecir el tamaño teórico de los FRT de aquellas especies o grupos bacterianos, cuya secuencia del gen ARNr 16S se conozca previamente, simplemente introduciendo los primers y enzimas de restricción utilizados en condiciones experimentales concretas. Dichos recursos permiten al usuario crear una base de datos de los microorganismos, que potencialmente pueden ser asignados, a partir de los datos experimentales obtenidos por T-RFLP. Esta base de datos es utilizada por los distintos programas de asignación filogenética para comparar el

tamaño de los FTR de las muestras problema con los FTR teóricos, que aparecen en dicha base de datos. Dado que un mismo FTR puede albergar diferentes secuencias y, por tanto, corresponder a distintas especies de bacterias, la especificidad de las asignaciones se incrementa notablemente cuando el análisis se lleva a cabo utilizando digestiones múltiples (Marsh *et al.*, 2000; Dunbar *et al.*, 2001). La mayor parte de los programas de asignación filogenética tienen en cuenta las discrepancias entre el tamaño teórico de los FTR y la de los observados en condiciones experimentales. Las discrepancias aumentan conforme lo hace el tamaño de los FTR. Por ello los mencionados programas tienen en cuenta un margen de tolerancia entre lo esperado o teórico y lo observado experimentalmente, de forma que las especies presentes en la muestra no queden fuera de la asignación. Algunos de estos programas de asignación filogenética han demostrado su eficacia y han sido validados mediante la comparación de sus resultados con los obtenidos mediante librerías de clones del gen ARNr 16S (Kent *et al.*, 2003; Junier *et al.*, 2008).

#### **2.4.5. Técnicas cuantitativas**

Estos métodos se clasifican básicamente en dos grupos: métodos cuantitativos, basados en la PCR, tales como la PCR a tiempo real (PCR cuantitativa), y métodos, que no dependen de una amplificación previa del ADN, basados en el uso de sondas marcadas, como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

##### **2.4.5.1. PCR cuantitativa**

La PCR convencional permite detectar el producto de la reacción en una etapa final en la que la amplificación no es exponencial, debido principalmente a la escasez de reactivos. Esta aproximación a la cuantificación puede proporcionar distintas cantidades del amplicón generado a partir de la misma cantidad de material genético (Freeman *et al.*, 1999). Sin embargo, la PCR a tiempo real (Higuchi *et al.*, 1993) permite que los amplicones, resultantes tras cada ciclo de amplificación, queden marcados por la incorporación de un agente fluorescente a la doble hebra de ADN recién formada, y, por tanto, la cuantificación del amplicón en la fase exponencial de la reacción, en la que

teóricamente, cada ciclo da lugar al doble del material existente y, por tanto, de la fluorescencia emitida (Rasmussen, 2001). Dada la proporcionalidad entre la fluorescencia emitida y la cantidad de ADN presente se puede cuantificar el número de copias de ADN en cada ciclo. El ciclo en el que la fluorescencia comienza a ser detectada, por encima de un umbral de fluorescencia (Threshold) prefijado en el inicio de la fase exponencial de la reacción, se denomina ciclo umbral ( $C_T$ ). Cuanto mayor sea la cantidad inicial de ADN menor número de ciclos ( $C_T$ ) se requerirán para alcanzar el umbral de fluorescencia. Dicho valor  $C_T$  debe introducirse en la ecuación de la recta de calibrado, obtenida a partir de diluciones seriadas de una cantidad conocida de ADN, para que se pueda establecer una relación directa entre la cantidad inicial de ADN, expresada en forma logarítmica, y el ciclo de amplificación:

$$\text{Log ADN}_i = -K \times C_T + B$$

Siendo K la constante de amplificación, obtenida a partir de la calibración estándar y que debe estar próxima a 0,30 para que la eficiencia de amplificación sea cercana al 100%; B es la ordenada en el origen que depende de la concentración de ADN del estándar.

La PCR cuantitativa permite ver la reacción completa y el producto generado en cada fase, durante toda la reacción. En su versión más económica, la PCR a tiempo real utiliza un agente de tinción de ADN inespecífico, SYBR Green. Este producto de tinción se une al surco menor de la doble hebra de ADN y emite fluorescencia de mucha mayor intensidad, en relación a su estado libre en la solución. Conforme la reacción de amplificación avanza y se van formando más amplicones de doble hebra la señal de fluorescencia emitida por el SYBR Green aumentará hasta ser detectada por el sensor del termociclador. Debido a que el SYBR Green se une indiscriminadamente a cualquier fragmento de doble hebra de ADN, es fundamental optimizar el protocolo de amplificación para que solo se amplifiquen los fragmentos diana de interés, evitando la formación de productos no específicos o de dímeros de los oligonucleótidos iniciadores (primers). El análisis de las curvas de disociación se debe realizar, rutinariamente, tras los ciclos de amplificación, para evaluar la pureza del

amplicón formado en cada reacción. Las curvas de disociación monitorean la pérdida de fluorescencia, cuando la temperatura se incrementa paulatinamente hasta un máximo en el que todas las dobles hebras, específicas o no, se hayan disociado, liberando, por tanto, el SYBR Green contenido en su surco menor. A una temperatura determinada, un solo amplicón, producto específico de la reacción, se disociará produciendo una curva con un solo pico de disociación. Cualquier producto amplificado, no deseado, será detectado durante este análisis al dar lugar a una curva con varios picos de disociación.

Otros sistemas de detección más evolucionados incluyen agentes, más específicos que el SYBR Green, como son las secuencias específicas de ADN marcado (Sondas Taqman o 5' nucleadas), reactivas a fragmentos amplificados. Estos agentes tienen la ventaja de ser muy específicos, de tal forma que aquellas amplificaciones inespecíficas no emiten fluorescencia ya que la sonda marcada no se une a ellos. Sin embargo, su uso presenta inconvenientes como el elevado coste y la dificultad de diseñar sondas específicas del fragmento diana a amplificar. De todas formas, no existen evidencias experimentales claras que muestren la superioridad de un método frente al otro (Maeda *et al.*, 2003), de modo que la correcta optimización del SYBR Green permite obtener niveles de sensibilidad similares al obtenido con sondas tipo TaqMan.

Mediante esta técnica se ha investigado la contribución de los protozoos a la actividad ruminal y al flujo duodenal de nitrógeno, con la administración de dietas diferentes (Sylvester *et al.*, 2004; Sylvester *et al.*, 2005) y se han cuantificado las poblaciones de diversas bacterias como *Megasphaera elsdenii* (Ouwkerk *et al.*, 2002; Klieve *et al.*, 2003), *Streptococcus bovis* (Klieve *et al.*, 2003) y *Butyrivibrio fibrisolvens* (Klieve *et al.*, 2003). Otros autores se han centrado en el estudio de la evolución de las poblaciones bacterianas ruminales al cambiar de una dieta basada en heno a otra constituida por grano (Tajima *et al.*, 2001) y en el estudio de las modificaciones producidas en las poblaciones de microorganismos del rumen al inocular contenido ruminal en fermentadores de flujo continuo y su evolución con el tiempo de incubación (Ziemer *et al.*, 2000).

#### **2.4.5.2. Hibridación in situ fluorescente (FISH)**

La hibridación in situ fluorescente o FISH es un método utilizado para la identificación y cuantificación de bacterias en su ambiente natural (Amman *et al.*, 1995; Assmus *et al.*, 1995), mediante el uso de sondas de ADN que hibridan secuencias específicas del gen ARNr 16S. Fue utilizada por primera vez en bacteriología por Giovannoni *et al.* (1988), con sondas marcadas radiactivamente. Aunque el fundamento del método no ha cambiado, actualmente las sondas fluorescentes han reemplazado a las radiactivas. A la tecnología de las sondas fluorescentes hay que añadirle aquellos sistemas de visualización, altamente específicos, como el microscopio de luz epifluorescente (Yanagita *et al.*, 2000), el microscopio de láser confocal (Manz *et al.*, 1995) o el citómetro de flujo (Zoetendal *et al.*, 2002), que permiten una cuantificación directa e individual de cada grupo bacteriano, sin destruirlo. El uso de diferentes sondas, marcadas con distintos fluorocromos, permite identificaciones múltiples, en una misma muestra o en un mismo campo microscópico (DeLong *et al.*, 1989). Con este método se evitan los artefactos y errores inherentes a la extracción de ADN, a la PCR y a la clonación (Wallner *et al.*, 1997). Los principales inconvenientes del FISH son su dependencia de la permeabilidad de la célula bacteriana (Lipoglavsek y Avgustin, 2004), de la accesibilidad a la secuencia diana (Amman *et al.*, 1995) y del número de ribosomas por célula. Además, la técnica FISH precisa de la existencia de secuencias de ARNr 16S en bases de datos y el número de sondas que se pueden utilizar en cada análisis es limitado.

Enumeraciones realizadas mediante FISH indican que un 54% de los microorganismos metanógenos totales del rumen de ovino pertenecen a la especie *Methanomicrobium mobile* (Yanagita *et al.*, 2000). Mackie *et al.* (2003) detectaron poblaciones de *Oscillospira spp.* en diferentes rumiantes por medio de FISH. No obstante, debido a que las sondas para FISH son limitadas, esta prometedora técnica está limitada para el estudio de la ecología del rumen (Zoetendal *et al.*, 2004).





## **CAPÍTULO 3**

### **Material y métodos**



Los resultados recogidos en las publicaciones que compendia esta memoria de tesis doctoral corresponden a dos experimentos diferentes. Por ello, en el presente capítulo se describen los materiales y métodos empleados en cada uno de los experimentos, o en ambos, cuando no se realiza ninguna especificación relativa al experimento.

### 3.1. Dietas

En la serie de ensayos correspondientes al experimento 1, se utilizan tres dietas experimentales: una, como tratamiento control, constituida por heno de alfalfa y concentrado (dieta AC), ofrecida a nivel de mantenimiento energético (Prieto *et al.*, 1990), y otras dos dietas en las que la mitad del concentrado de la dieta AC se sustituye por bloques multinutrientes, ofrecidos *ad libitum* (dietas ACBI y ACBII). La composición en ingredientes así como la composición química de estos aparecen en la **publicación 1 (Capítulo 4)**.

En los ensayos incluidos en el experimento 2 se utilizan, tanto *in vivo* como *in vitro*, dietas constituidas por forraje y concentrado. Se ensayan dos forrajes de distinta calidad: heno de alfalfa (A) y heno de gramíneas (G), y dos proporciones de forraje y concentrado (F:C), concretamente 70:30 y 30:70 en base a su contenido en materia seca (MS). De esta forma, resultan 4 dietas experimentales: GF (70G:30C), GC (30G:70C), AF (70A:30C) y AC (30A:70C), cuya composición aparece en las **publicaciones 2 y 3 (Capítulo 4)**. Estas dietas se suministran en cantidad suficiente para cubrir un 120% de las necesidades energéticas de mantenimiento de los animales experimentales (Prieto *et al.*, 1990).

### 3.2. Animales

En ambos experimentos se utilizan cabras de raza granadina ( $46,9 \pm 2.2$  kg peso vivo medio), canuladas en el rumen. Los animales reciben tratamiento antiparasitario (Ivomec, Lab MSD AGVET) intramuscular un mes antes del inicio de los experimentos y se adaptan a las condiciones de confinamiento en jaulas metabólicas antes del comienzo de los ensayos, para evitar comportamientos anormales que pudieran afectar la ingesta de las dietas. El manejo de los animales y los procedimientos experimentales se llevan a cabo

por personal cualificado, siguiendo las instrucciones del Real Decreto 1201/2005 relativo a la protección de los animales destinados a fines experimentales

### **3.2.1. Construcción e implantación quirúrgica de las cánulas ruminales**

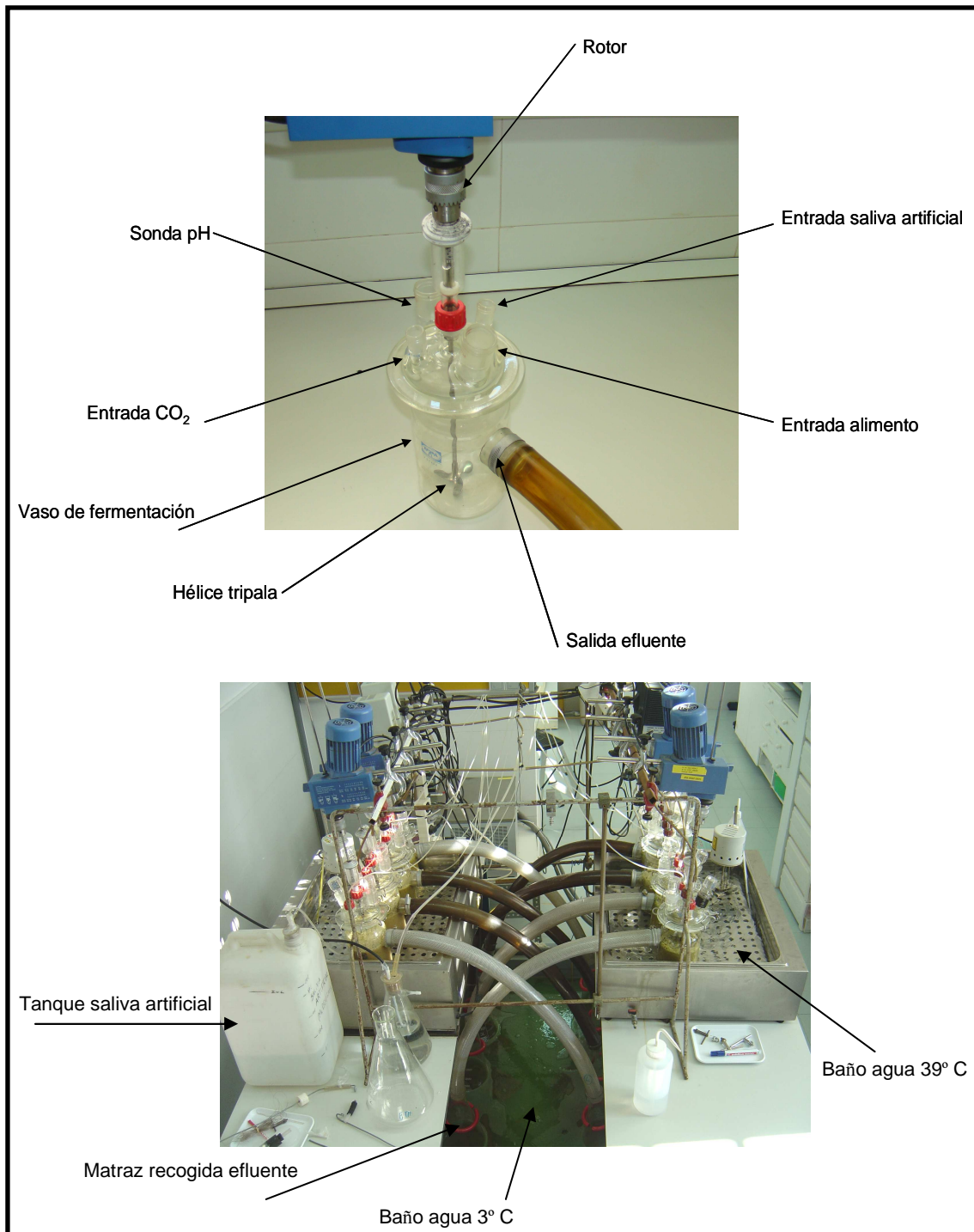
Se utiliza un molde de aluminio, construido expresamente para este fin, y goma sin recauchutar cruda, neutra y con un espesor de 0,8-1 mm (Michelín, ref. RIDAR 1-8, 580820). En cada una de las caras del molde, previamente impregnadas con vaselina, se colocan cinco capas de goma. El molde, cerrado herméticamente, se coloca en estufa durante 2 horas a 160°C, para proceder a la vulcanización de la goma. Una vez que el molde se enfría, se extrae la cánula, cuyo orificio central se cierra mediante un tapón de silicona comercial, fabricado manualmente con un molde de escayola. Durante los dos días previos a la intervención quirúrgica se administra a los animales, por vía intramuscular, un antibiótico con acción bactericida frente a gérmenes anaerobios (Augmentine, Lab. Smithkline Beecham; 0,14 ml/kg de peso vivo). Los animales no reciben alimento ni agua durante las 36 y 24 horas previas a la intervención, respectivamente. Quince minutos antes de comenzar la operación se toma la temperatura rectal de los animales y se les inyecta, por vía subcutánea, 1 ml de solución de Atropina al 1% p/v. Como preanestésico se emplea Rompún (Lab. Bayer), que se administra intramuscularmente (0,15 ml/10 kg de peso vivo). Como anestésico se emplea Ketolar (Lab. Parke-Davis), aplicado lentamente en la vena yugular, en una dosis inicial de inducción de 2 mg/kg de peso vivo. El estado de anestesia se mantiene aplicando, también a través de la yugular, 1 mg de anestésico por kg de peso vivo, a requerimiento de las manifestaciones de disminución del estado anestésico del animal (nistagmo y movimientos de respuesta al estímulo). La cánula se implanta en la fosa prelumbar izquierda. Para ello, se rasura y desinfecta la zona lavando con jabón antiséptico y aplicando povidona yodada (Betadine, Lab. Rovi). Se realiza una laparotomía oblicua izquierda, seccionando la piel, separando los haces de fibras de los diferentes planos musculares (músculos oblicuo externo, oblicuo interno y transversal del abdomen) y disecando el peritoneo. Este último se fija, mediante pinzas hemostáticas, y se practica una incisión para formar una abertura de tamaño

similar a la cutánea y así alcanzar la cavidad abdominal. Se localiza el saco dorsal del rumen en el que se practica una incisión vertical para implantar la cánula. La incisión se sutura cuidando de que contacten las mucosas para favorecer la fistulización. La unión de los distintos tejidos se hace por separado uniéndose el peritoneo al músculo transverso del abdomen y los dos músculos oblicuos del abdomen entre sí; todo ello con hilo de sutura absorbible Dexon 4/0 USP. La piel y tejidos subcutáneos se unen mediante sutura cruzada doble, con hilo de seda 2/0 USP (Lab Braun). Tras la intervención, los animales se alojan en jaulas individuales, con cama de paja y se les suministra agua, heno de alfalfa y mezcla minero-vitamínica en bloques. Durante los tres días posteriores a la operación se controla diariamente la temperatura rectal de los animales y se les administran antibióticos, como se ha mencionado para el periodo preoperatorio.

### 3.3. Fermentadores

Se utilizan ocho fermentadores de flujo continuo simple, contruidos siguiendo el esquema de Miettinen y Setälä (1989), con numerosas modificaciones (**Figura 3.1**). Cada fermentador consta de un vaso de fermentación de aproximadamente 1000 mL de volumen efectivo, cuyo tercio inferior se encuentra sumergido en un baño de agua a 39° C. Cada fermentador consta también de un matraz, mantenido en un baño de agua a 3° C para detener el crecimiento y la actividad microbiana, en el que se recogen los efluentes que abandonan el vaso de fermentación. El vaso de fermentación presenta cinco orificios de entrada y uno de salida. Los orificios de entrada, que se sitúan en la parte superior del vaso, permiten: i) introducir una varilla de acero con hélice tripala en su extremo inferior, encargada de la agitación constante del contenido del fermentador gracias al movimiento generado por un motor acoplado al extremo superior de dicha varilla; ii) administrar la dieta; iii) introducir la sonda del pH-metro; iv) infundir CO<sub>2</sub> para mantener la anaerobiosis y; v) infundir la saliva artificial (McDougall, 1948). La infusión continua de saliva mediante una bomba peristáltica (Watson-Marlow 313-S), se ajusta para permitir una tasa de renovación del contenido del vaso de fermentación de aproximadamente 5,33%/h. El orificio de salida del vaso de fermentación tiene

un diámetro de aproximadamente 3,10 cm y se sitúa en un lateral del tercio superior del vaso. De este orificio parte un conducto de goma rígida que conduce el efluente, que rebosa del vaso de fermentación hasta el matraz.



**Figura 3.1.** Componentes de los fermentadores de flujo continuo simple utilizados en esta Tesis doctoral

El contenido del rumen se extrae de cada animal, a través de la cánula, dos horas después del suministro del alimento de la mañana, con la ayuda de un tubo de PVC de 1,5 cm de diámetro, cuyo extremo distal se coloca en el saco ventral del rumen y al que se aplica una ligera succión. El contenido ruminal obtenido se mantiene en termos precalentados a 39° C. Una vez en el laboratorio, el contenido de los termos se filtra a través de 4 capas de gasas quirúrgicas sobre un matraz. Durante el proceso se infunde CO<sub>2</sub>. Desde que se extrae el contenido ruminal de los animales hasta que se inoculan los fermentadores, cada uno con 700 ml del filtrado aproximadamente, transcurren como máximo 30 minutos.

### **3.4. Desarrollo experimental**

#### **3.4.1. Ensayos *in vivo***

##### *3.4.1.1. Experimento 1*

El diseño experimental corresponde a un cuadrado latino 3 x 3 replicado de forma que cada tratamiento se ensaya en un total de 6 animales. El ensayo incluye 3 períodos experimentales, en cada uno de los cuales los animales se adaptan a las dietas en receptáculos individuales durante 25 días y en jaulas metabólicas durante 3 días más, para posteriormente comenzar con una fase de recogida o muestreo de 10 días de duración. Los animales reciben la dieta correspondiente en una sola toma a las 09:00 horas. Los 5 primeros días de la fase de muestreo se destinan a recoger diariamente la orina, recolectada en cubos que contienen 50 ml de ácido sulfúrico al 10%, con objeto de mantener un valor de pH < 3 en la orina recogida y evitar la degradación microbiana de sus derivados púricos. Se registra el volumen y peso de la orina producida y se toman diariamente alícuotas de aproximadamente 100 ml para conservarse a – 20° C hasta el análisis de su contenido en derivados púricos. Los días 6 y 7 se recoge, dos horas después de la administración del alimento, muestra suficiente (aproximadamente 500 ml) del contenido del rumen de cada animal y se conserva a – 20° C, hasta su utilización para el aislamiento de las fracciones bacterianas asociadas al componente líquido (BAL) y sólido (BAS) del



contenido del rumen y, que se utilizarán como referencia para la estimación del flujo de N al duodeno. Las muestras se descongelan lentamente, durante un día a 3° C, antes de proceder a la extracción de las fracciones bacterianas mencionadas. Todos los filtrados que se practican a continuación se llevan a cabo a través de 4 capas de gasas y la solución salina empleada (9 g NaCl/L agua destilada) es la misma en cada uno de los pasos. Una vez descongeladas las muestras, se homogenizan individualmente y se filtran (**Filtrado 1**). El residuo sólido, que resulta, se lava con el doble de peso de solución salina conservada a 4° C. La mezcla se filtra de nuevo (**Filtrado 2**) sobre el filtrado 1. La muestra líquida final, resultado de ambos filtrados (**Filtrado 1 + Filtrado 2**), se destina al aislamiento de las BAL, por centrifugación diferencial (Centrifuga Sorvall® RC6 Plus Sorvall instruments, Dupont): una primera centrifugación a 800 g durante 10 minutos a 4° C, para eliminar partículas de alimento y protozoos, y otra posterior a 27.800 g durante 10 minutos a 4° C a partir del sobrenadante obtenido en la primera centrifugación. El residuo final obtenido se recupera en placa de Petri y se conserva a – 20° C. Para el aislamiento de las BAS, el residuo sólido que resulta de la obtención del filtrado 2 se resuspende (2,5 ml/g residuo) en la solución salina y se somete a un golpeteo mecánico, con un masticador artificial (Masticador IUL Instruments GMBH, Königswinter, Alemania) durante 5 minutos, para desprender las bacteria asociadas a las partículas de alimento. A continuación se filtra dicha mezcla (**Filtrado 3**) y el residuo resultante se resuspende de nuevo con el mismo peso de la solución salina. La mezcla se filtra (**Filtrado 4**) sobre el filtrado 3 y el conjunto se centrifuga de forma similar a lo indicado para BAL, obteniéndose así un residuo que representa a la fracción de las BAS, que se recupera igualmente en placa de Petri y se congela a – 20° C. Los residuos congelados correspondientes a las BAL y BAS de cada animal y tratamiento se liofilizan, se muelen finamente con la ayuda de un pequeño mortero y se analiza su contenido en MO, N y BP. Durante los días 8 y 9 del periodo experimental se toman muestras de 100 ml de contenido del rumen a las 0, 2, 4 y 6 horas tras la administración de las dietas a los animales. Estas muestras se filtran a través de dos capas de gasa y se registra inmediatamente su pH (pH-metro Metrohm 691 dotado de sonda y adaptado para mediciones de pH entre 0 y 14, a temperaturas de 0 a 80°C). A continuación, se toman dos alícuotas del filtrado: una de 5 ml a la que se

añaden 5 ml de HCl 0,5 N para la determinación de la concentración de N-NH<sub>3</sub> y, otra de 800 µl a la que se añaden 800 µl de una solución de HCl 0,5 N, que contiene, además, ácidos ortofosfórico y crotónico (patrón interno), para la determinación del contenido en ácidos grasos volátiles (AGV). En el último día de la fase de muestreo se obtiene suficiente cantidad de contenido del rumen de cada animal dos horas después de la toma del alimento para inocular el vaso de uno de los 6 fermentadores de flujo continuo simple utilizados en el ensayo *in vitro*, que transcurre en paralelo. A cada fermentador se le administra la misma dieta consumida por el animal donador de su inóculo.

#### 3.4.1.2. Experimento 2

El diseño experimental corresponde a un cuadrado latino 4 x 4 en el que los tratamientos se disponen según un factorial 2 x 2 (2 forrajes x 2 proporciones F:C), de forma que cada una de las 4 dietas experimentales se ensaya en un total de 4 animales diferentes. El ensayo consta de 4 periodos de 20 días de duración cada uno, dividido en una fase de adaptación de 10 días, en la que los animales se habitúan a las jaulas metabólicas y dietas administradas, y en una fase de muestreo de otros 10 días o periodo experimental propiamente dicho. Al inicio y final de cada período los animales se pesan con objeto de calcular sus nuevas necesidades energéticas de mantenimiento y evaluar la condición de mantenimiento deseada (peso final – peso inicial). El peso considerado de cada animal para posteriores cálculos será la media entre el peso inicial y el final dentro de cada período. Las dietas se administran a los animales repartidas en dos tomas iguales, a las 09:00 y a las 15:00 horas.

Al inicio de cada período experimental se toman muestras representativas de todos los ingredientes y se conservan a – 20° C hasta su análisis. Durante los 7 primeros días de la fase de muestreo se recogen y se pesan diariamente las heces y la orina así como los rehusos de los ingredientes no ingeridos. Posteriormente se toma una alícuota de cada tipo de muestra (20%, 10%, y 30% de heces, orina y rehusos, respectivamente) y se conservan a –20° C hasta su análisis. La orina se recolecta diariamente, de la misma forma descrita en el exp. 1, durante estos primeros 7 días.

Previamente a su análisis, las muestras de heces se liofilizan mientras que las del alimento (suministrado y rehusado) se desecan en estufa de ventilación forzada a 60 ° C durante 48 h, estabilizándose ambos tipos de muestras, a continuación, durante 48 horas a temperatura ambiente. Las muestras de heces, ingredientes y rehusos se muelen en molino de cuchillas (Retsch, Mod. SM-1) con tamiz de 1 mm para la determinación analítica del contenido en MS, MO, EE, N total, FND, FAD, LAD y EB. Los carbohidratos no fibrosos (CNF) se calculan como  $CNF = MO - (FND + PB + EE)$ . El porcentaje de digestibilidad aparente (%Da) se calcula como:  $\%Da = (I-E/I) \times 100$ , siendo I la cantidad de nutriente ingerido y E la de nutriente excretado, ambos expresados en función de la materia seca de alimento y heces.

Las muestras de orina se descongelan y se filtran a través de papel de filtro, procediéndose, a continuación, a la determinación de su contenido en N total y, tras su liofilización, a la determinación de su contenido en EB. Durante los 3 últimos días de la fase de muestreo se toman alícuotas de 50 ml de la orina recogida para determinar su densidad y analizar su contenido en derivados púricos, a fin de estimar el flujo de nitrógeno microbiano al duodeno. El día 8 de la fase de muestreo se realiza también una recogida seriada del contenido del rumen a las 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h tras la ingestión matutina del alimento, con objeto de analizar parámetros de la fermentación ruminal. En cada uno de los muestreos se obtienen alícuotas de 100ml, que se filtran a través de 4 capas de gasa, se homogeniza el filtrado y se mide el pH. A continuación, se toman tres alícuotas del filtrado ruminal: dos para la determinación de la concentración de N-NH<sub>3</sub> y AGV, preparadas de forma idéntica a lo descrito para el exp. 1, y una tercera de 10 ml para su fijación, tinción y posterior recuento de protozoos ruminales, siguiendo el protocolo descrito por Dehority (1984). Los protozoos observados durante su recuento se clasifican dentro de los Ordenes Entodiniomorpha (Entodiniomorfos) o Trichostomatia-Prostomatida (Holotricos). Además, coincidiendo con la hora 2 del muestreo seriado se recogen aproximadamente 50 ml de contenido del rumen, mediante un tubo falcon estéril, acoplado al extremo distal de un alambre rígido, que permite la recogida de una muestra representativa del contenido del rumen, destinada al estudio de su comunidad bacteriana mediante técnicas moleculares.

El último día del periodo de muestreo se lleva a cabo la recogida de aproximadamente un litro de contenido del rumen de cada uno de los animales para el aislamiento de BAL y BAS siguiendo el protocolo descrito por Martín-Orué *et al.* (1998), con ligeras modificaciones. Todos los filtrados que se realizan a continuación se llevan a cabo a través de 4 capas de gasa y una de nylon, con tamaño de poro de 50  $\mu\text{m}$ , y la solución salina empleada (8,5 g NaCl/l agua destilada) es la misma en cada paso. El contenido del rumen se filtra individualmente (**Filtrado A**). El residuo sólido obtenido se resuspende con el doble de peso de una solución salina conservada a 39° C. Tras la agitación manual la mezcla se filtra de nuevo (**Filtrado B**). El conjunto de filtrados A + B se destina al aislamiento de las BAL, por centrifugación diferencial. En un primer paso la mezcla se centrifuga a 500 g durante 5 minutos para eliminar las partículas de alimento y los protozoos menores de 50 micras. Posteriormente el sobrenadante se centrifuga a 20.000 g durante 20 minutos y a 4° C. El residuo bacteriano obtenido se lava con solución salina y se centrifuga nuevamente a 20.000 g durante 20 minutos y a 4° C. El residuo lavado se recupera en placa de Petri y se congela a – 20° C. Para el aislamiento de las BAS, el residuo sólido que resulta de la obtención del filtrado B, se mezcla con el mismo peso de una solución salina a 39° C, que contiene 1g/L de metilcelulosa como agente surfactante encargado de desprender las bacterias adheridas a las partículas del alimento. Esta mezcla se agita mecánicamente (110 oscilaciones/min) en un baño de agua a 39° C durante 30 minutos y, a continuación, se filtra (**Filtrado C**). El residuo que resulta de este último filtrado se incuba durante 24 horas a 4° C con el doble de peso de la solución salina que contiene 1g/L de metilcelulosa. La mezcla obtenida se homogeneiza en una batidora comercial, con 10 pulsos de baja intensidad. El homogeneizado que resulta se filtra de nuevo (**Filtrado D**). El conjunto de filtrados C + D se destina al aislamiento de las BAS utilizando la misma secuencia de centrifugaciones descrita para el aislamiento de BAL.

Finalizado el ensayo *in vivo* se procede a la extracción de contenido del rumen para la inoculación de los fermentadores a utilizar en los ensayos *in vitro*.

### 3.4.2. Ensayos *in vitro*

#### 3.4.2.1. Experimento 1

Al igual que el ensayo *in vivo* correspondiente al mismo experimento su diseño experimental corresponde a un cuadrado latino 3 x 3 replicado. Las dietas ensayadas son las mismas que las utilizadas en los ensayos *in vivo* previos administrándose 75 g (MS) diariamente a cada fermentador, repartidos en dos tomas iguales a las 09:00 y 16:00 horas. Cada período experimental de incubación se divide en una fase de adaptación de 7 días, para permitir que se alcance un equilibrio en las condiciones *in vitro*, y otra fase de muestreo de 4 días de duración. A lo largo de todo el período de incubación se mide el pH diariamente antes de la administración de las dietas. En el primer día de la fase de muestreo se recolecta individualmente todo el efluente producido por cada fermentador, se somete a un intenso golpeteo mecánico, de forma similar a lo mencionado para el aislamiento de BAS del ensayo *in vivo* del mismo experimento. A continuación se filtra a través de 4 capas de gasas y el residuo obtenido se lava con solución salina (9 g/L agua destilada) a 4° C para volverse a filtrar, de la misma forma, sobre el filtrado anterior. El conjunto de ambos filtrados se somete a una centrifugación diferencial similar a la descrita para el ensayo *in vivo* del mismo experimento, obteniéndose un residuo o fracción bacteriana que representa a las bacterias totales presentes en el efluente (BE). Los días 3, 4 y 5 de la fase de muestreo se destinan a recoger, pesar y medir el volumen del efluente producido por cada fermentador, antes de conservarlos a – 20° C. Al final de cada período experimental los efluentes de un mismo fermentador y tratamiento se juntan, y se toman dos alícuotas destinadas a la determinación de AGV y N-amoniaco, preparadas de igual forma a la descrita en el ensayo *in vivo*. El resto se liofiliza y se analiza su contenido en MS, MO, N total, y bases púricas. El último día de la fase de muestreo se recoge todo el contenido del vaso de fermentación para proceder al aislamiento de las BAL y BAS, de forma análoga al ensayo *in vivo* del mismo experimento.

#### 3.4.2.2. Experimento 2

Una vez se obtiene el inóculo ruminal, según se ha descrito anteriormente, se procede a introducir en cada vaso de fermentación 700 ml del inóculo. Cada

dos fermentadores reciben el inóculo procedente de un animal alimentado con la misma dieta a ensayar en esta pareja de fermentadores. Los ensayos *in vitro* se dividen, igualmente, en un período de adaptación de 7 días y otro de recogida de 5 días. Cada fermentador se alimenta diariamente con 30 o 45 g (MS) de la dieta correspondiente, repartidos en dos tomas iguales administradas a las 9:00 y a las 15:00 horas, de tal forma que el diseño experimental corresponde a dos cuadrados latinos independientes donde los tratamientos se disponen de la misma forma que en el ensayo *in vivo*. Cada uno de los dos cuadrados latinos realizados en paralelo en este ensayo recibe una cantidad de dieta diferente: 4 fermentadores reciben 30 g MS y otros 4 fermentadores reciben 45 g MS. El pH se registra dos veces al día antes de cada toma del alimento. En cada periodo y diariamente, los efluentes producidos se pesan y se mide su volumen. Durante los días 8, 9 y 10 se toman alícuotas del efluente para la determinación de las concentraciones de amonio y de AGV, siguiendo el protocolo descrito en los ensayos *in vivo*, y de N total y, a continuación, se mantienen a -20° C hasta proceder a su análisis. Los efluentes correspondientes a los tres días de muestreo y a cada fermentador se mezclan, y una vez congelada la mezcla se liofiliza para proceder al análisis de sus contenidos en MS, MO, EE, FND y FAD. El día 11 se lleva a cabo un muestreo seriado del contenido del fermentador, idéntico al realizado *in vivo*. El último día de cada ensayo (día 12) se procede a recoger el efluente producido de todos los fermentadores y el contenido del vaso de aquellos fermentadores alimentados con 45 g de MS, para llevar a cabo el aislamiento de bacterias totales del efluente (BE) y de las fracciones de BAL y BAS, respectivamente.

La producción diaria de nitrógeno no amoniacal (NNA) de ambos experimentos se calcula a partir de las concentraciones de nitrógeno total y amoniacal en los efluentes y del peso los mismos. El porcentaje del NNA de origen microbiano se calcula utilizando la relación bases púricas:nitrógeno (BP:N), analizada tanto en el efluente como en las fracciones bacterianas aisladas. La fórmula que se emplea es la siguiente:  $FNM = FNNA \times (BP:N_{EF} / BP:N_{BACT})$ ; siendo: FNM = flujo de nitrógeno microbiano, mg/fermentador/día; FNNA = flujo de nitrógeno no amoniacal, mg/fermentador/día; BP:N<sub>EF</sub> = relación bases púricas: nitrógeno determinada en el efluente,  $\mu\text{mol/mg}$  y; BP:N<sub>BACT</sub> =

Relación bases púricas: nitrógeno determinada en las bacterias aisladas,  $\mu\text{mol/mg}$ .

La digestibilidad aparente de nutrientes en los fermentadores se calcula como la proporción que representa dicho nutriente en los efluentes con respecto a la cantidad suministrada al fermentador. En el caso de la materia seca es necesario llevar a cabo una corrección, teniendo en cuenta la cantidad de sales disueltas en la saliva artificial infundida (Crawford *et al.*, 1980) y la pérdida, por volatilización, de algunas de estas sales durante el proceso de liofilización.

La digestibilidad verdadera se calcula detrayendo de la producción total en el efluente la correspondiente a la masa microbiana, para lo cual resulta necesario analizar la composición de las fracciones bacterianas utilizadas como referencia para el cálculo del flujo de N microbiano, descrito en el apartado anterior. Por ejemplo, la digestibilidad verdadera de la materia seca se calcula mediante la siguiente fórmula:  $\% \text{ DvMS} = ((\text{MSs} - (\text{MSe} - \text{MSb}')) + \text{MSm})/\text{MSs} \times 100$ ; siendo: DvMS = digestibilidad verdadera de la materia seca, %; MSs = cantidad de materia seca suministrada al fermentador, g/día; MSe = materia seca total producida en el efluente, g/día; MSb' = materia seca de la saliva artificial presente en los efluentes y corregida para las pérdidas producidas durante el proceso de liofilización, g/día y ; MSm = materia seca de la masa microbiana estimada en el efluente, g/día

El procedimiento que se sigue para la determinación de los parámetros de la fermentación ruminal *in vitro* es similar al descrito para el ensayo *in vivo* con algunas salvedades. El pH se mide directamente en el vaso de fermentación y no del filtrado. No se realiza recuento de los protozoos en los ensayos *in vitro* en base a resultados previos (Moumen, 2003) que indican la disminución o desaparición en fermentadores desde el día siguiente a su inoculación. Al igual que en el ensayo *in vivo*, en la hora 2 del muestreo seriado se toma una alícuota de 2 ml en condiciones estériles, destinada al estudio de las poblaciones bacterianas del fermentador mediante técnicas moleculares.

El aislamiento de las fracciones bacterianas BAL y BAS a partir del contenido de los fermentadores alimentados con 45g de MS/día se realiza siguiendo el procedimiento ya descrito en el ensayo *in vivo*. La fracción de bacterias totales del efluente (BE) se obtiene por centrifugación diferencial de la

mezcla de todos los filtrados (A + B + C + D) obtenidos durante el tratamiento que se sigue para aislar BAL y BAS. De esta forma se obtiene un residuo representativo de ambas fracciones.

### **3.5. Técnicas experimentales y analíticas**

Puesto que la mayor parte de las técnicas experimentales y analíticas se han descrito con detalle en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación (Martín García, 2001; Yáñez Ruiz, 2003; Moumen, 2003; Martín García *et al.*, 2004), en este capítulo se hace una descripción pormenorizada de las técnicas moleculares, que representan una novedad con respecto a trabajos anteriores del grupo.

En el experimento 2 se lleva a cabo un estudio de las comunidades bacterianas presentes tanto en el contenido del rumen y del fermentador, como en las fracciones bacterianas aisladas *in vivo* (BAL y BAS) e *in vitro* (BAL, BAS y BE). Para ello, se utilizan dos técnicas de caracterización molecular, basadas en la huella genética digital o técnicas “fingerprinting”: T-RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos terminales de restricción) y DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante). Por otro lado, la cuantificación de las bacterias totales presentes en las muestras del contenido del rumen y del fermentador se realiza mediante una PCR cuantitativa. Estos análisis moleculares se llevan a cabo en el laboratorio del Profesor J. Newbold del Instituto de Ciencias Rurales de la Universidad de Abersytwyth durante una estancia predoctoral. La preparación de las muestras y extracción de su ADN fueron idénticas para las 3 técnicas moleculares empleadas.

#### **3.5.1. Preparación de las muestras**

Las muestras se mantienen a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su liofilización. Posteriormente se lleva a cabo una molienda manual grosera, con la ayuda de una espátula estéril y bajo una campana de extracción de flujo laminar para evitar posibles contaminaciones. A partir de las muestras liofilizadas y homogenizadas se rellena un tubo de 2 ml con tapón de rosca hasta tres cuartos de su capacidad, bajo una campana de extracción. El tubo de 2 ml contiene 3 bolas metálicas, igualmente estériles. Una vez cerrado el tubo que



contiene la muestra y las bolas metálicas se mantiene a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante al menos 5 minutos para introducirse, posteriormente, en un agitador Minibeadbeater<sup>TM</sup> (Biospec products Inc., Bartlesville, Oklahoma). La fuerte oscilación del agitador (máxima velocidad: 5000 rpm) durante 1 minuto produce la rotura y molienda fina de las muestras en su interior, gracias al golpeo constante de las pequeñas esferas con el material cuyo ADN se pretende extraer. La agitación y congelado posterior a  $-80^{\circ}\text{C}$  impide un calentamiento excesivo del material, que podría desnaturalizar el ADN, y facilita la rotura del material vegetal al que ciertas bacterias (BAS) se encuentran firmemente adheridas.

### 3.5.2. Extracción del ADN

Se utiliza el kit de extracción de ADN de QIAGEN QIAamp® DNA (Qiagen Ltd., UK). La extracción y aislamiento del ADN se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones. Puesto que el material de partida se encuentra liofilizado y, por tanto, con una alta concentración de ADN, se toma una cantidad menor (50-60 mg) a la indicada en el protocolo del fabricante para muestras frescas (180-220 mg). La cantidad que se toma en el caso de muestras de fracciones bacterianas es aún menor (20-30 mg). Para maximizar la extracción de ADN la temperatura se eleva a  $90^{\circ}\text{C}$  en aquellos pasos en que el protocolo lo recomienda para la rotura de la pared de bacterias Gram positivas, resistentes a altas temperaturas. La aplicación conjunta de métodos físicos (Minibeadbeater<sup>TM</sup>) y químicos (QIAGEN QIAamp® DNA) junto con la elevación de la temperatura a lo largo de la extracción evita una lisis preferencial de bacterias y, por tanto, una extracción no selectiva del ADN, procedente de bacterias Gram positivas o Gram negativas (Frostegard *et al.*, 1999).

### 3.5.3. T-RFLP

#### 3.5.3.1 Amplificación del ADN mediante PCR

El ADN que se extrae de las muestras puede ser de origen viral, bacteriano, protozoario, fúngico o proceder de organismos pluricelulares. Por tanto, se hace necesaria la utilización de cebadores o “primers” específicos de

bacterias que permitan amplificar selectivamente el ADN de este grupo microbiano. Dado que el ADN amplificado se somete, posteriormente, a una electroforesis que permita la detección de un extremo marcado con fluorescencia se requiere, además, que uno de los cebadores contenga un fluoróforo en uno de sus extremos (Liu *et al.*, 1997; Osborn *et al.*, 2000). Los dos primers utilizados (MWG Biotech, UK) para amplificar específicamente el gen del 16S bacteriano son el 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTG AG-3'), marcado con cianina en su extremo 5', y el 1389R (5'-AGG GGG GGT GTG TAG AAG-3'), sin marcar (Hongoh *et al.*, 2005). Las amplificaciones se llevan a cabo en un termociclador de BIORAD (MyCycler™ thermal cycler, USA). El protocolo de amplificación incluye una desnaturalización inicial a 94° C durante 5 minutos, seguida de 25 ciclos con las siguientes rampas de temperatura y tiempos:

- Fase de desnaturalización a 94° C, durante 1 minuto
- Fase de anillamiento a 55° C, durante 1 minuto
- Fase de elongación a 72° C, durante 1 minuto

Por último, una fase de elongación a 72° C durante 2 minutos, para completar todas las extensiones no finalizadas por la enzima ADN polimerasa, en ciclos anteriores. Las temperaturas de disociación de los cebadores 27F y 1389R son 57,3° C y 58,2° C, respectivamente. La elección de las temperaturas requiere un compromiso entre la disminución del porcentaje de anillamientos no deseados entre cebadores y una alta especificidad de los mismos sobre sus secuencias diana. El número de ciclos en el termociclador se establece en 25 para evitar errores debidos a la polimerización, que pudieran dar lugar, a su vez, a un reconocimiento erróneo de las enzimas de restricción y, por tanto, a perfiles, determinados por T-RFLP, modificados (Osborn *et al.*, 2000). Los cebadores se eligen para producir un amplicón de una longitud cercana a la del gen 16S para abarcar la mayor diversidad potencial de la secuencia bacteriana a estudiar. Los componentes de la mezcla que se emplea en la amplificación del gen 16S bacteriano se detallan en la **Tabla 3.1**.

**Tabla 3.1.** Composición, volumen y concentración de los componentes de una mezcla de PCR de 10 reacciones

| Componentes                                   | Volumen (μl) /reaccion | Volumen total (μl) |
|---|------------------------|--------------------|
| Tampón termofílico de la ADN polimerasa (10x) | 5.0                    | 50.0               |
| MgCl <sub>2</sub> (25mM)                      | 3.0                    | 30.0               |
| Desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) (10mM)    | 1.0                    | 10.0               |
| Primer 27F marcado con cianina (50μM)         | 0.25                   | 2.5                |
| Primer 1389R (50μM)                           | 0.25                   | 2.5                |
| Taq ADN polimerasa (5U/μl)(Promega)           | 0.5                    | 5.0                |
| Agua destilada estéril                        | 38.0                   | 380                |
|   | Master mix (μl)        | 480                |
|   | Mix por tubo (μl)      | 48                 |
|   | Vol. de muestra (μl)   | 2                  |

La amplificación, tamaño del amplicón y la posible contaminación se verifican mediante la electroforesis del producto de la PCR en un gel de agarosa. Dicho gel se prepara con una concentración del 1% de agarosa en 50 ml de tampón TAE 1X (obtenido a partir de solución TAE 10x: Tris base 0,4mM, Ácido acético 0,2M, EDTA 0,01M, Sambrook *et al.*, 1989) y 0,5 μl de un producto de tinción fluorescente (Gelstar®; Cambrex Bioscience, UK), necesario para visualizar los fragmentos de ADN con luz ultravioleta (240 nm). Siete μl de una solución tampón (0,25% Orange G y 30% glicerol en agua, almacenada a 4° C) se adicionan a 3 μl del producto de la PCR, y dicha mezcla se transfiere a cada uno de los pocillos del gel de electroforesis. Para verificar el tamaño de los fragmentos se incluyen, en al menos un pocillo por fila, 5 μl de un marcador de 1kb de peso molecular (Promega®, USA). La electroforesis se lleva a cabo con una intensidad de 7V/cm durante 40 minutos aproximadamente o hasta que las bandas de tinción se acercan al final del gel. Los fragmentos de ADN separados se visualizan al UV en un equipo transiluminador Bio-Rad, Gel Doc™ XR. Cuando existe ADN en el pocillo correspondiente al control negativo, todas las muestras de esa tanda se vuelven a analizar para evitar contaminaciones con bacterias distintas a las del rumen, que pudieran sesgar los resultados.

### 3.5.3.2. Purificación del producto de la PCR.

El producto de la PCR se purifica para eliminar cualquier tipo de sal contaminante o componentes de la mezcla no incorporados durante la reacción (dNTPs, Taq polimerasa y cebadores). Para ello, aproximadamente 47μl del

producto de la PCR se completan hasta los 100  $\mu$ l con una solución tampón TE (10 mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 7,5, Sambrook *et al.*, 1989). Dicha mezcla se transfiere a una placa de PCR de 96 pocillos Millipore MultiScreen® a la que se le aplica vacío (Edwards High Vacuum Pump), hasta que el volumen sea mínimo en los pocillos pero suficiente para prevenir la desecación del ADN. El ADN concentrado se resuspende en 60  $\mu$ l de agua destilada estéril por pocillo y, se agita sobre una placa de agitación (JK MS2 minishaker) a 1000 rpm, durante al menos 10 minutos. El producto de la PCR, purificado y resuspendido, se mezcla y se transfieren 50  $\mu$ l a un tubo eppendorf de 0,2 ml almacenándose a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### 3.5.3.3. Digestión enzimática del ADN amplificado y preparación de la muestra

Puesto que el pico correspondiente a un fragmento de restricción terminal (FRT) concreto, de los obtenidos mediante la aplicación de la técnica T-RFLP, no procede necesariamente de una única especie o incluso género bacteriano, se utiliza más de una enzima de restricción para incrementar la resolución en la identificación de microorganismos. Al generarse varios perfiles de digestión a partir de la misma muestra, la posibilidad de que una especie concreta comparta picos con otras se reduce. En nuestros ensayos se utilizan cuatro enzimas de restricción: *HaeIII* (GG\*CC), *HhaI* (GCG\*C), *MspI* (C\*CGG) y *RsaI* (GT\*AC). Previamente, se determina la concentración del ADN tras la purificación, mediante espectrofotometría (Nanodrop® ND-1000 spectrophotometer) y las muestras se diluyen hasta una concentración de 20 ng ADN/ $\mu$ l para estandarizar la digestión del ADN bacteriano (Osborn *et al.*, 2000; Kitts, 2001). Los reactivos necesarios para llevar a cabo la digestión con la enzima *HaeIII* (Promega®, USA) y con las enzimas *HhaI*, *MspI* y *RsaI* (Q Bio gene, Europe) aparecen especificados en las **Tablas 3.2 y 3.3**, respectivamente. Tras su preparación se mezclan los reactivos y el ADN a digerir. Las muestras y la mezcla preparadas se mantienen en hielo, a lo largo de todo el proceso, para evitar la iniciación prematura de las reacciones de digestión enzimática. Las muestras se incuban en termociclador a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 5 horas y, posteriormente, a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos para desnaturalizar e

inactivar las enzimas de digestión, una vez completada la digestión propiamente dicha. Para eliminar cualquier sal procedente del tampón de digestión, que pudiera interferir con la electroforesis subsecuente, se lleva a cabo la purificación del producto de la digestión enzimática (Kitts, 2001). Para ello, a 50  $\mu$ l del producto de la digestión se les añade una mezcla compuesta por 4  $\mu$ l de EDTA (100 mM), 4  $\mu$ l de acetato de sodio 3M (pH = 5,2) y 4  $\mu$ l de glicógeno (20 mg/ml) y se agita. Para precipitar los fragmentos de ADN digeridos se adicionan 120  $\mu$ l de etanol al 96% y  $-80^{\circ}$  C. La mezcla descrita se centrifuga a 3.000 rpm y  $4^{\circ}$  C durante 15 minutos, para obtener un residuo que incluye todos los fragmentos de ADN digeridos. El sobrenadante que resulta se elimina mediante decantación manual y rápida. A continuación se adicionan 200  $\mu$ l de etanol al 70% y  $-20^{\circ}$  C para limpiar el residuo mencionado.

**Tabla 3.2.** Reactivos para la digestión con *HaeIII*

| Reactivos                           | Volumen por reacción ( $\mu$ l) |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| Agua destilada estéril              | 14.8                            |
| ADN (20ng/ $\mu$ l)                 | 2.5                             |
| Subtotal                            | 17.3                            |
| <b>Master mix</b>                   |                                 |
| Tampón 10x enzimas restricción*     | 2.0                             |
| BSA acetilado*, 10 $\mu$ g/ $\mu$ l | 0.2                             |
| <i>HaeIII</i> , 10U/ $\mu$ l        | 0.5                             |
| Subtotal                            | 2.7                             |
| Total                               | 20.0                            |

\* Suministrado por el fabricante

**Tabla 3.3.** Reactivos para la digestión con *HhaI*, *MspI* y *RsaI*

| Reagent                                 | Volumen por reacción ( $\mu$ l) |
|---|---------------------------------|
| ADN (20ng/ $\mu$ l)                     | 2.5                             |
| <b>Master mix</b>                       |                                 |
| Agua destilada estéril                  | 15.2                            |
| Tampón 10x enzimas restricción con BSA* | 2.0                             |
| Enzima de restricción, 10U/ $\mu$ l     | 0.3                             |
| Subtotal                                | 17.5                            |
| Total                                   | 20.0                            |

\* Suministrado por el fabricante

Las muestras se centrifugan de nuevo en las mismas condiciones y se decanta de nuevo el sobrenadante (etanol + impurezas). Se lleva a cabo una

tercera adición de etanol (70% y -20° C) y centrifugación, que aseguren una mejor limpieza del residuo. Tras la última decantación la placa que alberga los fragmentos de ADN se deja a temperatura ambiente durante 15 minutos para que se evapore el etanol. Esta desecación se realiza en la oscuridad para evitar que el extremo de los fragmentos terminales, marcado con fluorescencia, se degrade. A continuación se le añaden 35 µl de un tampón de carga estándar (buffer SLS CEQ™, Beckman Coulter) y 0,2 µl de un estándar de ADN (Size-Standard 600 kit; GenomeLab™, Beckman Coulter), que posee fragmentos cuyo peso molecular se sitúa en el rango 60 - 640 pb, con intervalos de 20 nucleótidos, y todos marcados en uno de sus extremos con fluorescencia. Este estándar de ADN permite determinar eficazmente los tamaños de los fragmentos a analizar, dentro del rango mencionado (Liu *et al.*, 1997). La muestras se agitan durante 15 minutos para facilitar que los fragmentos contenidos en el residuo desecado se homogenicen con el tampón de carga y el estándar de ADN.

#### **3.5.3.4. Análisis de los fragmentos de restricción terminales**

Para analizar los fragmentos terminales de restricción, las muestras, preparadas según se ha descrito en el punto anterior, se transfieren a una placa de secuenciación de 96 pocillos (Sample Microtiter plate, Beckman Coulter Inc.), que se introduce en el secuenciador (Beckman Coulter CEQ™ 8000 Genetic Analysis System sequencer). Para evitar la evaporación de las muestras se añade una gota de aceite mineral. Los picos de los fragmentos de ADN se analizan mediante el sistema de análisis genético Beckman Coulter CEQ™ 8000 y, la alineación de los mismos se lleva a cabo mediante la aplicación AFLP (amplified fragment length polymorphism) del programa. El tamaño de los FRT se estima comparando su tiempo de retención con el del estándar interno de ADN, incorporado previamente a la muestra. Estudios previos (Osborn *et al.*, 2000; Kaplan y Kitts, 2004), utilizando el mismo algoritmo Local Southern, han encontrado una menor divergencia entre los tamaños teóricos de los fragmentos y los observados. El tamaño de los fragmentos se calibra y cuantifica mediante la versión 2 del AE, según las recomendaciones del fabricante, que tienen en cuenta el peso adicional del

marcador cianina en el cebador que lee en sentido 5' → 3' ("forward"). La pendiente umbral se utiliza para detectar y eliminar los picos más anchos y pequeños, mientras que la altura relativa del pico establece la altura mínima que cada pico individual puede representar respecto al segundo pico más alto para no ser considerado ruido. La pendiente umbral y la altura relativa del pico se fijan en 1% (rango 1-1000) y 0% (rango 0-100%), respectivamente, para recuperar la mayor parte de los picos presentes en los electroferogramas y, posteriormente, filtrarlos en función de su tamaño relativo. Los picos seleccionados por el programa, siguiendo los criterios mencionados, se clasifican con la mencionada aplicación AFLP dentro de un grupo, con un rango de 1 pb, de tal forma que el pico de mayor tamaño, dentro del intervalo de 1 nucleótido, representa a todos los fragmentos que incluye. Los datos relativos a la altura absoluta y el tiempo de retención del pico seleccionado en cada grupo se transportan a una hoja de cálculo (Microsoft® Excel). La lista de todos los fragmentos, obtenidos tras la filtración, se exporta igualmente para la identificación de bacterias, a partir del tamaño de los FRT obtenidos con las 4 enzimas de restricción. A continuación, se normalizan las alturas dividiendo sus valores entre la suma total de alturas de los picos presentes en la muestra. Ello favorece una comparación más equitativa entre muestras que puedan presentar concentraciones diferentes de ADN, por errores debidos al pipeteo en el proceso de preparación de las muestras. Se eliminan todos aquellos picos normalizados cuya altura represente menos del 0,5% de la altura total de los picos, para separar el ruido analítico de aquellos picos que si representan fragmentos de ADN y, por tanto, especies bacterianas. A continuación, el archivo de Excel se prepara según las especificaciones del programa CAP 4 (Community Analysis Package V.4.1.3 ©Pisces Conservation), que analiza los patrones obtenidos en cada muestra. Los datos importados se someten a un análisis de clusters utilizando una combinación de las distancias Hellinger (Distancias Euclidianas entre perfiles después de transformar las alturas relativas de los picos con la función raíz cuadrada; Legendre y Gallagher, 2001) y el método de análisis Ward's (SAS Institute, Inc.). Los datos se someten igualmente a un análisis de componentes principales (PCA) y discriminante (DA), utilizando el programa CAP 4. La caracterización de las poblaciones bacterianas se completa con la obtención del índice de diversidad Shannon

(Shannon and Weaver, 1963) y con la identificación filogenética de grupos bacterianos. El índice Shannon (H) se calcula como:  $H = - \sum p_i \ln(p_i)$  siendo p la relación entre el tamaño del fragmento i respecto a S, y S el tamaño total de fragmentos en la muestra. Este índice es un indicador de la diversidad de una comunidad microbiana, mayor cuanto más elevado sea el valor del índice Shannon.

### 3.5.3.5. Identificación bacteriana

Los FRT detectados, para cada una de las cuatro digestiones enzimáticas, permiten llevar a cabo asignaciones filogenéticas. Para ello se realiza una selección de picos, distinta a la comentada anteriormente: la pendiente y la altura relativa de los picos se fijaron en 10% y 5%, respectivamente para asegurar la no inclusión de picos correspondientes a ruido analítico. Por otra parte, se elabora una base de datos de todas las especies bacterianas potencialmente identificables utilizando los cebadores 27F y 1389R y las enzimas de restricción *HaeIII* (GG\*CC), *HhaI* (GCG\*C), *MspI* (C\*CGG) y *RsaI* (GT\*AC), mediante la aplicación "Virtual digest (ISPaR)" que aparece en el programa MiCA (Microbial Community Analysis III; <http://mica.ibest.uidaho.edu/digest.php>). Dicha base de datos se modifica de forma que todas aquellas especies bacterianas con idéntica longitud de sus FRT para una misma enzima se reducen a una sola entrada en la base de datos, y se eliminan todos los FRT inferiores a 40 pb y superiores a 600 pb. Para generar datos sobre la diversidad bacteriana, en cada nivel filogenético, el número de acceso proporcionado por MICA se utiliza para obtener una clasificación filogenética completa de dicha especie, con la ayuda del sitio web Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>), de tal forma que el nombre de la especie bacteriana identificada se reemplaza por su clasificación completa. Así por ejemplo, "*Lactobacillus brevis* HDRS2", se reemplaza por su clasificación completa: "\Filum Firmicutes Clase Bacilli Orden Lactobacillales Familia Lactobacillaceae Género Lactobacillus/ Especie Lactobacillus brevis HDRS2". La asignación filogenética de los FRT de cada muestra se establece utilizando el programa de asignación filogenética PAT (Phylogenetic Assignment Tool; Kent *et al.*, 2003), con la base de datos creada previamente y



la elección de un criterio de “tolerancia de tamaño” polinomial (1.0, 1.5 y 4.0 pb de tolerancia para fragmentos de hasta 200, 400 y 600 pb, respectivamente), que tiene en cuenta que las discrepancias entre el tamaño de los FTR teóricos y observados aumentan al hacerlo el tamaño de los mismos. Los datos proporcionados por el análisis PAT se procesan en una hoja de cálculo, en la que las funciones de buscar y contar permiten generar la diversidad de una muestra dada, en cada estrato jerárquico. Las barras de las gráficas que resultan de dicho análisis representan, por tanto, el número de especies bacterianas diferentes identificadas que pertenecen al estrato filogenético correspondiente. En ningún caso dichos porcentajes aluden a conceptos de abundancia sino de diversidad.

### **3.5.4. DGGE**

#### **3.5.4.1. Amplificación del ADN mediante PCR**

A partir del extracto de ADN genómico de las muestras (apartado 2.5.1) se amplifican fragmentos de aproximadamente 200 pb de ADN bacteriano, cuyos extremos pertenecen a una región conservada del gen 16S a la que se unen los cebadores universales de bacterias utilizados: “forward” 5’CCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCTACGGGAG GCAGCAG-3’ y “reverse” 5’-ATTACCGCGGCTGCTGG-3’. (Nubel *et al.*, 1996). Además, la región intermedia del fragmento de 200 pb amplificado con dichos primers es hipervariable (V3-V6) entre grupos bacterianos, permitiendo obtener numerosas copias del gen 16 S con la información necesaria para separar grupos filogenéticos de bacterias diferentes. Un fragmento, compuesto por guanina y citosina de aproximadamente 40 pb (GC-clamp), se inserta en uno de los cebadores para obtener un perfil de bandas más adecuado en condiciones de desnaturalización (Muyzer *et al.*, 1993). El protocolo de amplificación incluye los siguientes pasos: desnaturalización a 94° C durante 4 minutos, 25 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 1 minuto, anillamiento a 55° C durante 1 minuto y elongación a 72° C durante 1 minuto. Finalmente, se lleva a cabo una elongación de 10 minutos a 72° C para completar las cadenas no finalizadas. Los ciclos de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador de BIORAD (MyCycler™ thermal cycler, EEUU) utilizando

volúmenes de 50 µl. El tamaño y especificidad del fragmento amplificado así como la posible contaminación en la PCR se comprueban mediante la electroforesis del producto de la PCR en un gel de agarosa. Dicho gel se prepara con 2,5% de agarosa en 50 ml de tampón TAE, empleándose un marcador de peso molecular similar al utilizado para la T-RFLP. Los fragmentos de ADN separados se visualizan con luz UV en un equipo transiluminador (BioRad, Gel Doc™ XR). Una vez comprobado el tamaño y la amplificación específica del ADN bacteriano, mediante electroforesis, se emplea el resto del producto de la PCR para llevar a cabo la DGGE.

#### **3.5.4.2. Electroforesis**

Se realiza empleando el sistema de electroforesis de C.B.S. Scientific® (C.B.S. Scientific, Inc., EEUU). Los geles para la electroforesis contienen un 8 % de acrilamida (40%, 29:1) y un gradiente desnaturalizante de urea y formamida de 50-65 %. Previo a la preparación del gel los cristales que los contendrán durante la electroforesis se lavan con solución Decon al 5 %. A continuación se lavan con agua destilada y se desecan en estufa a 60 °C y se polimeriza añadiendo persulfato de amonio al 1%. Los cristales y los geles se introducen en el tanque de electroforesis con 25 litros de buffer TAE 1x precalentado a 60 °C. En cada pocillo del gel se introduce una mezcla de 20 µl de producto de PCR y se añaden 5 µl de tampón de carga, similar al utilizado para la T-RFLP. Una vez que han cargado en el gel se lleva a cabo la electroforesis durante 16 horas a 130V, 200 mA y 250 W.

#### **3.5.4.3. Tinción, visualización y análisis de bandas.**

Tras la electroforesis los geles se desprenden de los cristales y se depositan en bandejas de vidrio de 30 x 30 cm, con 100 ml de metanol al 40% y ácido acético al 10% durante 60 minutos. Se tiñen las bandas con sales de plata empleando el kit comercial de Amersham Biosciences (Uppsala, Suecia), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la tinción el gel se escanea empleando un escáner GS-800 Calibrated Imaging Densitometer (BioRad) y la imagen se analiza mediante el programa Quantity One® Software (BioRad). El análisis del patrón de bandas se realiza teniendo en cuenta la

presencia/ausencia de cada banda en los carriles de migración electroforética de cada muestra. El registro de presencia/ausencia de todo el gel se traduce a una matriz binaria en la que 1 representa presencia y 0 ausencia de una determinada banda. El análisis filogenético de la matriz binaria resultante se lleva cabo mediante la generación, en primer lugar, de una matriz de similitud del programa NEIGHBOUR (Phylogeny Inference Package, EEUU), que posteriormente será la base para obtener un dendrograma o árbol filogenético aplicando el método de agrupamiento UPGMA (unweighed pair-group method using arithmetic averages). La distancia filogenética de los distintos grupos generados por el método se evalúa a partir del porcentaje de similitud en una escala de 0 a 100. La matriz binaria del perfil de bandas se emplea, igualmente, para el cálculo de la diversidad conjunta de grupos de muestras, siguiendo la metodología descrita por Marrugan (1988). El índice de diversidad empleado (Índice de Shannon) se calcula como  $H = - \sum p_i \cdot \ln(p_i)$ , siendo la proporción de la *i*-ésima especie (asumiendo que una banda corresponde a una especie bacteriana), en una comunidad de *S* especies.

### 3.5.5. PCR cuantitativa.

A partir del ADN extraído (apartado 2.5.1) se lleva a cabo una cuantificación de bacterias totales mediante un protocolo de PCR a tiempo real. Se utilizan los cebadores forward-5'-CGGCAACGAGCGCAACCC-3' y reverse-5'-CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC-3' (McSweeny and Denman, 2007). La cuantificación se realiza con la ayuda de un termociclador DNA (Engine Opticon® System, PTC-200 DNA EngineTMCycler (MJ Research, UK), y las muestras se analizan siempre por triplicado. Al igual que en la PCR se añade un control negativo, consistente en agua estéril, también por triplicado. Este control permite detectar tanto la contaminación como de la formación de posibles dímeros no deseados, y a partir de él, establecer la fluorescencia de fondo para fijar un ciclo umbral. Las reacciones de amplificación se preparan en una placa específica, de 96 pocillos, que permite que la fluorescencia emitida por la reacción de amplificación se dirija hacia la apertura de cada tubo, merced a la opacidad de sus paredes. El detector de fluorescencia del equipo sitúa el sensor a nivel de esa apertura para captar toda la fluorescencia que se emite. Todas las reacciones se preparan en un volumen de 50 µl, que incluye 1

µl de la muestra de ADN extraído, 0,25 µl de cada cebador y 25 µl de la mezcla SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma, Poole, Dorset, UK), que contiene Tris-HCl 20mM (pH 8,3), KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 7 mM, cada uno de los 4 dNTP a 0,4 mM, 0,05 unidades/µl de Taq ADN polimerasa, JumpStart Taq, y SYBR Green I como producto de tinción. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una fase inicial de 95° C durante 5 minutos, 40 ciclos con la secuencia 95° C durante 15 segundos, 55° C durante 15 segundos y, 72° C durante 30 segundos. Las lecturas de la fluorescencia se toman al final de cada fase de extensión (72° C). Finalizada la amplificación a tiempo real, se analizan las curvas de disociación sobre el producto resultante para establecer si el fragmento amplificado tiene el tamaño esperado o si se formaron dímeros no deseados durante la reacción. Las curvas de disociación se programan con una rampa suave, con incrementos de 0,1° C por segundo, desde los 45 hasta los 95° C, con lecturas de la fluorescencia a intervalos de 0,2° C. El ciclo umbral, en el que la fluorescencia emitida durante la formación del amplicón es superior a la del control negativo, se determina para cada muestra individual y siempre se establece en la fase exponencial de la amplificación. Todos los análisis realizados posteriormente se llevan a cabo con la ayuda del programa MJ Research Opticon Monitor (Version 1.06, UK). La concentración total de ADN bacteriano se determina utilizando una curva estándar, generada a partir del ADN, extraído de una mezcla de bacterias ruminales cultivadas durante 24 horas en medio Hobson 2 (Stewart *et al.* 1997). Las cepas utilizadas fueron las siguientes: *Prevotella ruminicola* 23, *Butyrivibrio fibrisolvens* SH13, *Ruminococcus albus* SY3, *Prevotella albensis* M384, *Clostridium sticklandii* 12662, *Peptostreptococcus anaerobius* 27337, *Ruminococcus flavefaciens* Fd1, *Mitsuokella multiacidus* 46/5, *Selenomonas ruminantium* 2388, *Lachnospira multipara* D15d, *Veillonella parvula* L59, *Prevotella bryantii* B14, *Prevotella brevis* GA33, *Lactobacillus casei* LB17, *Clostridium aminophilum* 49906, *Streptococcus bovis* ES1 and *Megasphera elsdenii* J1.

### 3.6. Tratamiento estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevan a cabo con el paquete estadístico SPSS® v.15 para Windows, mediante la utilización de alguno de los siguientes modelos:

- Análisis unifactorial de la varianza (ANOVA simple). Este tipo de análisis se lleva a cabo para conocer si existen diferencias entre las medias de los tratamientos debidas a un solo factor, como es el caso del efecto dieta en el exp. 1. Además cuando existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) debidas a cualquier efecto analizado con otros modelos (**Exp. 1:** dieta (D), origen (O), pellet bacteriano (P) o interacción D x P y D x O; **Exp. 2:** tipo de forraje (F), relación F:C (F:C), pellet bacteriano (P'), origen (O') o interacción F x C y P' x O') se realiza una comparación entre medias utilizando la aplicación de comparaciones múltiples post-hoc del programa y el test de Bonferroni (exp. 1) o de Tukey (exp. 2).
- Análisis de modelos lineales generales (GLM). En el exp. 1 se utiliza para analizar los efectos principales fijos, sistema y dieta, y su interacción. En el exp. 2 se emplea para el análisis de los efectos principales fijos dentro de cada ensayo, tipo de forraje y relación F:C, y de su interacción sobre variables no repetidas en el tiempo.
- Análisis de modelos mixtos. Se utiliza para el análisis de los efectos estudiados sobre variables repetidas en el tiempo del exp. 2, que puedan estar correlacionadas con el animal (ensayo *in vivo*) o el fermentador (ensayo *in vitro*) del que proceden (Littell *et al.*, 1998). Cuando se pretende comparar la evolución en el tiempo de parámetros de la fermentación ruminal, la interacción triple refleja la similitud ( $P > 0,05$ ) o diferencia ( $P < 0,05$ ) entre los factores analizados.

## **CAPÍTULO 4**

### **Publicaciones**



**PUBLICACIÓN 1**

**Experimento 1**

**(Publicado en Journal of Animal Science. 2009, 87:1321-1333)**

Efectos de la sustitución del concentrado por bloques multinutrientes sobre la fermentación ruminal y el crecimiento microbiano en cabras y fermentadores de flujo simple continuo

**Effects of concentrate replacement by feed blocks on ruminal fermentation and microbial growth in goats and single-flow continuous-culture fermenters**





# Effects of concentrate replacement by feed blocks on ruminal fermentation and microbial growth in goats and single-flow continuous-culture fermenters<sup>1</sup>

E. Molina-Alcaide,\*<sup>2</sup> M. R. Pascual,† G. Cantalapiedra-Hijar,\* E. Y. Morales-García,\* and A. I. Martín-García\*

\*Estación Experimental del Zaidín (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Profesor Albareda, 1, 18008 Granada, Spain; and †Departamento de Zootecnia, Facultad de Veterinaria, 10071 Cáceres, Spain

**ABSTRACT:** The effect of replacing concentrate with 2 different feed blocks (FB) on ruminal fermentation and microbial growth was evaluated in goats and in single-flow continuous-culture fermenters. Diets consisted of alfalfa hay plus concentrate and alfalfa hay plus concentrate with 1 of the 2 studied FB. Three trials were carried out with 6 rumen-fistulated Granadina goats and 3 incubation runs in 6 single-flow continuous-culture fermenters. Experimental treatments were assigned randomly within each run, with 2 repetitions for each diet. At the end of each in vivo trial, the rumen contents were obtained for inoculating the fermenters. For each incubation run, the fermenters were inoculated with ruminal fluid from goats fed the same diet supplied to the corresponding fermenter flask. The average pH values, total and individual VFA, and NH<sub>3</sub>-N concentrations, and acetate:propionate ratios in the rumen of goats were not affected ( $P \geq 0.10$ ) by diet, whereas the microbial N flow (MNF) and efficiency were affected ( $P \leq 0.001$ ), with the greatest values observed for the diet without FB. In fermenters, the diet affected pH ( $P < 0.001$ ), propionate concentrations ( $P = 0.01$ ), acetate:propionate ratio ( $P = 0.03$ ), carbohydrate di-

gestibility ( $P = 0.05$ ), and total ( $P = 0.02$ ), NH<sub>3</sub> ( $P = 0.005$ ), and non-NH<sub>3</sub> ( $P = 0.02$ ) N flows, whereas the efficiency of VFA production was not affected ( $P = 0.75$ ). The effect of diet on MNF and efficiency depended on the bacterial pellet used as a reference. An effect ( $P < 0.05$ ) of diet on the composition of solid- and liquid-associated bacteria was observed. The compositions of liquid-associated bacteria in the fermenter contents and effluent were similar ( $P \geq 0.05$ ). Differences ( $P < 0.001$ ) between in vivo and in vitro values for most fermentation variables and bacterial pellet compositions were found. Partial replacement of the concentrate with FB did not greatly compromise carbohydrate fermentation in unproductive goats. However, this was not the case for MNF and efficiency. Differences between the results obtained in vivo and in vitro indicate a need to identify conditions in fermenters that allow better simulation of fermentation, microbial growth, and bacterial pellet composition in vivo. Reduced feeding cost could be achieved with the inclusion of FB in the diets of unproductive goats without altering rumen fermentation.

**Key words:** bacterial pellet, feed block, goat, microbial growth, rumen fermentation, single-flow continuous-culture fermenter

©2009 American Society of Animal Science. All rights reserved.

J. Anim. Sci. 2009. 87:1321–1333  
doi:10.2527/jas.2008-1263

## INTRODUCTION

Livestock production in Mediterranean countries is constrained by the scarcity and high price of feedstuffs such as cereals and soybean meal. Feed blocks (FB) based on local resources and by-products (Ben Salem and Nefzaoui, 2003) might be used to overcome this situation. Because olive trees and the derived industries are of great importance in Mediterranean countries, their by-products are of economic and environmental interest. The most important by-product is the crude 2-stage olive cake (CTSOC), composed of olive pulp, skin, and stones as well as water (Hermoso et al., 1995).

<sup>1</sup>This research was supported by the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (Project AGL2004-04755-C02-02) and Junta de Andalucía (Project P07-RNM-2746). G. Cantalapiedra gratefully acknowledges support from the Ministerio de Ciencia e Innovación for the Formación de Profesorado Universitario grant. Thanks to J. Fernández, V. Toledano, and A. Moumen for technical assistance and to Aceites Sierra Sur (Granada, Spain) for providing the crude 2-stage olive cake.

<sup>2</sup>Corresponding author: molina@eez.csic.es

Received June 27, 2008.

Accepted December 12, 2008.

Production of CTSOC accounts for 2,000,000 t/yr (Molina-Alcaide and Yáñez-Ruiz, 2008) with high pollutant potential, in part because of its high moisture content. Use of CTSOC has never been studied for ruminant feeding. Feed blocks including local resources (Ben Salem and Nefzaoui, 2003) and by-products could allow for the substitution of part of the concentrate in goat diets without compromising rumen fermentation. This could decrease the amount of cereals required in ruminant diets. Local legume seeds or by-products, such as sunflower meal, could be alternatives to soybean meal. Additionally, FB utilization could decrease the feeding cost. The effect on ruminal fermentation and microbial growth of partial substitution of a concentrate, composed of 800 g/kg of cereal and 160 g/kg of soybean meal, with FB including only 320 g/kg of barley grain and local sources of N (180 g/kg of sunflower meal or 400 g/kg of fava beans) as well as by-products such as CTSOC and beet molasses, was estimated by using different bacterial pellets as a reference in goats and in single-flow continuous-culture fermenters. Direct comparisons of rumen fermentation and bacterial pellet composition *in vivo* vs. *in vitro* are limited, and most have been conducted in cows (Hannah et al., 1986; Mansfield et al., 1995). We compared the results obtained in goats with those from single-flow continuous-culture fermenters.

## MATERIALS AND METHODS

All management and experimental procedures involving animals were carried out by trained personnel in strict accordance with the Spanish guidelines (Act No. 1201/2005 of October 10, 2005) for experimental animal protection.

### *Animals and Diets*

Six adult, dry, nonpregnant, rumen-fistulated Granadina goats ( $46.9 \pm 2.2$  kg of BW) were used. The animals were placed in individual boxes and had free access to water. Three experimental diets were formulated with alfalfa hay plus concentrate (diet **AC**) and alfalfa hay plus concentrate with FB (diets **ACBI** and **ACBII**). Concentrate and FB were handmade and the relative cost of ingredients was estimated; the composition of the ingredients is shown in Table 1. In both cases, solid ingredients were ground (2 mm) and mixed in a horizontal mixer (model C, P. Prat, Sabadell, Spain). The concentrate was then granulated in a rotating pelletizer (Vector CPM Europe, Andrijftechniek B.V., Rotterdam, the Netherlands) by spraying it with water. Block manufacturing followed the protocol of Ben Salem and Nefzaoui (2003), with modifications. Solid ingredients were mixed with a liquid mixture composed of water quicklime, salt, sugarcane molasses, urea, and CTSOC, and then heavily packed in aluminum molds.

Compacted blocks were taken from the molds, air-dried at room temperature, and stored until use.

### *In Vivo Ruminal Fermentation and N Flow*

Animals were previously adapted to the experimental diets for 25 d in individual boxes to achieve adequate intake of FB, as defined by Ben Salem and Nefzaoui (2003). Animals were then adapted to metabolic cages for 3 d, and three 10-d trials were conducted. Experimental treatments were assigned randomly within each experimental trial, with 2 repetitions for each diet. Animals were fed once a day with 600 g of alfalfa hay plus 400 g of concentrate (diet **AC**), or 600 g of alfalfa hay plus 200 g of concentrate and FB I (diet **ACBI**) or FB II (diet **ACBII**). Feed blocks were supplied for *ad libitum* intake, resulting in average intakes of  $180 \pm 80$  and  $291 \pm 61$  g/d for FB I and II, respectively. No refusals were observed for hay or concentrate. From d 1 through 5, total urine was collected daily in the morning from each animal in buckets with 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to maintain acidic pH and avoid degradation of purine derivatives (**PD**) by microorganisms. The urine was then weighed, and 100-mL aliquots were taken for PD analysis. On d 6 and 7, rumen content samples (500 mL) were obtained from each animal 2 h after feeding and pooled for isolation of solid- (**SAB**) and liquid (**LAB**)-associated bacteria. On d 8 and 9, rumen content samples (100 mL) were obtained from each animal 0, 2, 4, and 6 h after feeding and strained through 2 layers of cheesecloth. The pH was then measured, and aliquots were taken for NH<sub>3</sub>-N and VFA analyses. On d 10, rumen contents were obtained for single-flow continuous-culture fermenter inoculation.

### *In Vitro Ruminal Fermentation and Microbial Growth*

Six single-flow continuous-culture fermenters (Miettinen and Setälä, 1989) were used. Fermenters were inoculated with rumen fluid from rumen-fistulated Granadina goats used for *in vivo* trials. Rumen contents were collected from each animal 2 h after feeding, immediately transported to the laboratory in thermal bottles, and strained through 2 layers of cheesecloth; 700 mL of filtrate was inoculated into each fermenter within 30 min after rumen content collection. Three identical 11-d incubation runs were carried out. Experimental treatments were assigned randomly within each incubation run so that each dietary treatment was applied to 6 fermenters by the end of 3 trials. Diets consisted of 45 g of alfalfa hay and 30 g of concentrate (diet **AC**), 45 g of alfalfa hay, 15 g of concentrate, and 15 g of FB I (diet **ACBI**) or FB II (diet **ACBII**), on a fresh matter basis, supplied in 2 equal portions at 0900 and 1600 h. Flow-through fermenters were maintained by continuous infusion of McDougall (1948) artificial

**Table 1.** Composition of diet ingredients

| Item                                  | Alfalfa hay | Concentrate | Feed block I | Feed block II |
|---------------------------------------|-------------|-------------|--------------|---------------|
| Ingredient, g/kg as fed               |             |             |              |               |
| Oat                                   | —           | 350         | —            | —             |
| Corn grain                            | —           | 350         | —            | —             |
| Crude 2-stage olive cake              | —           | —           | 120          | 100           |
| Fava beans                            | —           | —           | —            | 400           |
| Barley grain                          | —           | 100         | 320          | 200           |
| Soybean meal                          | —           | 160         | —            | —             |
| Beet molasses                         | —           | —           | 210          | 110           |
| Sunflower meal                        | —           | —           | 180          | —             |
| Quicklime                             | —           | —           | 70           | 90            |
| NaCl                                  | —           | 10          | 60           | 60            |
| Urea                                  | —           | —           | 10           | 10            |
| Vitamin-mineral mixture <sup>1</sup>  | —           | 30          | 30           | 30            |
| Nutrient, g/kg of DM                  |             |             |              |               |
| DM, g/kg of fresh matter              | 864         | 860         | 790          | 760           |
| OM                                    | 894         | 901         | 731          | 740           |
| CP                                    | 175         | 159         | 168          | 172           |
| Ether extract                         | 13.6        | 3.9         | 3.4          | 2.6           |
| NDF                                   | 491         | 214         | 167          | 127           |
| ADF                                   | 331         | 59          | 80           | 24            |
| ADL                                   | 84.1        | 6.8         | 13.0         | 1.9           |
| GE, MJ/kg of DM                       | 16.9        | 16.7        | 12.5         | 13.3          |
| Purine bases, $\mu\text{mol/g}$ of DM |             |             |              |               |
| Adenine                               | 7.8         | 10.0        | 15.4         | 14.5          |
| Guanine                               | 9.1         | 4.0         | 3.9          | 3.6           |
| Total                                 | 16.9        | 14.0        | 19.3         | 18.1          |

<sup>1</sup>Contained (per kilogram): NaCl, 277 g; ash from the 2-stage dried olive cake, 270 g;  $\text{CaH}_4(\text{PO}_4)_2$ , 250 g;  $\text{MgSO}_4$ , 200 g; CuO, 184 mg; I, 25 mg; CoO, 8.5 mg; Se, 4 mg; ZnO, 2.28 mg; 83,500 IU of vitamin A; and 16,700 IU of vitamin D.

saliva at a rate of 40 mL/h (5.33% dilution rate), and  $\text{CO}_2$  was continuously infused to maintain anaerobic conditions. The effluent from each fermenter was collected into a vessel maintained at 3°C to prevent microbial growth.

Each incubation run included 7 d for adaptation and 4 d for sampling. Twice a day, the pH was measured in the vessels immediately before feeding. On d 8, the total effluent from each fermenter was collected and subjected to vigorous mechanical pummeling between 2 metal plates (Masticator, IUL Instruments GmbH, Königswinter, Germany) for 5 min to detach bacteria from the feed particles (Michalet-Doreau and Ould-Bah, 1992), and the effluent was strained through 4 layers of cheesecloth. The solid fraction was washed with cold (4°C) NaCl solution (9 g/L) and strained through 4 layers of cheesecloth. The final filtrate was centrifuged at  $800 \times g$  for 10 min at 4°C to remove feed particles. The supernatant fraction was centrifuged at  $27,800 \times g$  for 10 min at 4°C to isolate effluent bacteria (**EB**). On d 9, 10, and 11, the total effluent from each fermenter was collected and the weight and volume were recorded before storage at -20°C. At the end of the trial, pooled subsamples from each fermenter and sampling day were made. Aliquots were taken for  $\text{NH}_3\text{-N}$  and VFA concentration analyses. The remainder was freeze-dried and analyzed for DM, OM, total N, and purine bases (**PB**). Fermenter contents collected on the last sampling day were used for SAB and LAB isolation.

For SAB and LAB isolation, rumen and fermenter contents were strained through 4 layers of cheesecloth. The solid residue was washed with cold (4°C) NaCl solution (9 g/L) and strained again through 4 layers of cheesecloth. The final filtrate was used to isolate LAB by differential centrifugation following the procedure described previously for the EB pellet. The solid fraction was resuspended in cold (4°C) NaCl solution (2.5 mL/g of solid), subjected to vigorous mechanical pummeling as described above, and strained through 4 layers of cheesecloth. The solid residue was washed with cold (4°C) NaCl solution (9 g/L) and strained, and the filtrate was added to that obtained previously. The final mixed filtrate was differentially centrifuged as described for EB to isolate the SAB pellet. All bacterial pellets were lyophilized and ground to a fine power with a mortar and pestle before analysis for N, OM, and PB.

### Chemical Analyses

Dry matter (method 934.01), ash (method 942.05), and N (method 984.13) were determined in samples of diet ingredients, effluents, and bacterial pellets according to the AOAC (1999). Samples of diet ingredients were analyzed for NDF, ADF, and ADL according to the methods of Van Soest et al. (1991) by using an Ankom<sup>220</sup> Fiber Analyzer unit (Ankom Technology Corporation, Macedon, NY). No amylase was used for

analysis of NDF, and both NDF and ADF were analyzed by excluding residual ash. The ADL was determined by solubilization of cellulose with sulfuric acid. The ADIN was determined by Kjeldahl analysis of ADF residues. Free, protein-bound, and fiber-bound condensed tannins were sequentially extracted following the procedure described by Pérez-Maldonado and Norton (1996). Condensed tannins from quebracho powder (Roy Wilson Dickson Ltd., Mold, UK) were used as a standard. The GE content was determined in an adiabatic calorimeter (model 1356, Parr Instrument Co., Moline, IL). Ether extract (method 7.045; AOAC, 1999) was analyzed in the diet ingredient and effluent samples. Rumen content and effluent samples were also analyzed for total and individual VFA by gas chromatography following the method described by Isac et al. (1994). The  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentration of these samples was determined by a colorimetric method (Weatherburn, 1967). The PD in urine samples and the PB in the effluents and bacterial pellets were determined following the method described by Balcells et al. (1992).

### *Calculations and Statistical Analyses*

Total carbohydrate content of the diets was calculated as the OM content minus the content of both CP and ether extract. The apparent digestibility of total carbohydrates in vitro was calculated from the intake and output of carbohydrates. Carbohydrate content in the effluents was calculated as described for the diets but was corrected for the amount of OM in the VFA. The daily flow of microbial N was estimated for each fermenter by multiplying total non- $\text{NH}_3\text{-N}$  (NAN) production by the PB:N ratio of the effluent, EB, LAB, or SAB, or the average of LAB and SAB. In goats, the daily flow of microbial N was estimated from the urinary PD concentration (Belenguer et al., 2002) and from the PB:N ratio of bacterial pellets (LAB, SAB, or the average of both).

To compare the effect of diet on fermentation, digestibility, and N metabolism (including PB:N) within animals or fermenters, data were analyzed by 1-factor ANOVA (SPSS Inc., Chicago, IL). Diet was considered a fixed effect. The experimental model in fermenters allowed the study of diet (D) and pellet (P) effects and their interaction ( $D \times P$ ), which was given by  $Y = \mu + D_i + P_j + (D \times P)_{ij} + \varepsilon$ , where  $\mu$  is the overall mean and  $\varepsilon$  is the model error. For comparing in vivo and in vitro systems, the experimental model accounted for origin (O, animal or fermenters) and diet (D) effects and their interaction ( $D \times O$ ), which was given by  $Y = \mu + D_i + O_j + (D \times O)_{ij} + \varepsilon$ , where  $\mu$  is the overall mean and  $\varepsilon$  the model error. In both cases, the data were analyzed with the GLM procedure by using univariate ANOVA with 2 fixed factors (SPSS Inc.). The period, animal, and fermenter vessel were considered random effects. When significant effects of diet, bacterial pellet, origin, or their interactions were found,

post hoc comparisons of means were made by using the Bonferroni test. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### *In Vivo Ruminant Fermentation and N Flow*

Average pH, total and individual VFA,  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentrations, and the acetate:propionate ratio in the rumen of goats were not affected ( $P \geq 0.10$ ) by diet (Table 2). Acetate was the primary VFA. At 2 h after feeding, the least pH values and the greatest VFA and  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentrations were observed (data not shown). The PB:N ratios for SAB ( $P = 0.01$ ) and for the average of SAB and LAB ( $P = 0.03$ ) were affected by diet. In contrast, the PB:N ratio for LAB was not affected ( $P = 0.23$ ) by diet. The PB:N ratio in SAB for animals fed diets including FB I were greater ( $P = 0.01$ ) than those for animals fed diet AC, but were similar ( $P \geq 0.05$ ) to values found in animals fed diet ACBII. When the PB:N ratio for SAB or the average of SAB and LAB was used, microbial N flow (MNF,  $P = 0.004$  and  $0.001$ , respectively) and efficiency ( $P = 0.008$  and  $P < 0.001$ , when expressed as g of microbial N/kg of OM ingested, and  $P = 0.005$  and  $P < 0.001$ , when expressed as g of microbial N/kg of digestible OM) were greater in animals fed diet AC compared with those fed diets including either FB, which were similar to each other ( $P \geq 0.05$ ). Microbial N flow values and efficiencies obtained with LAB were not affected by diet ( $P \geq 0.10$ ).

### *In Vitro Ruminant Fermentation, Microbial Growth, and Bacterial Pellet Composition*

In fermenters (Table 3), an effect of diet on average pH values ( $P < 0.001$ ) was observed. The greatest value was found for fermenters given diet ACBII, but values were similar ( $P \geq 0.05$ ) in fermenters given diets AC and ACBI. Production of total VFA was not affected by diet ( $P = 0.86$ ). An effect of diet was observed for propionate ( $P = 0.01$ ) and butyrate ( $P = 0.01$ ) molar proportions and for the acetate:propionate ratio ( $P = 0.03$ ). Propionate was greater only for diet AC compared with ACBII. Butyrate was less for diet ACBI in comparison with diets AC and ACBII, which showed similar ( $P \geq 0.05$ ) values. The acetate:propionate ratios were least for diet AC in comparison with diets including either FB, which were similar ( $P \geq 0.05$ ). Carbohydrate digestibility was greater in fermenters fed ACBII than in those fed AC, but efficiency of VFA production was not affected by diet ( $P = 0.75$ ). The PB:N ratio was affected by diet ( $P \leq 0.04$ ). The greatest PB:N ratio for both SAB and EB were observed in fermenters given diet ACBI, whereas for LAB and the average SAB and LAB, the greatest values were found in fermenters fed diets including FB compared with diet AC. True dietary OM digestibility was affected ( $P = 0.01$ )



**Table 2.** Average pH, VFA, and NH<sub>3</sub>-N concentrations, and microbial growth and efficiency, using different bacterial pellets, in the rumen of goats fed the experimental diets<sup>1</sup>

| Item <sup>2</sup>                      | Diet              |                   |                    | SEM   | P-value |
|--|-------------------|-------------------|--------------------|-------|---------|
|  | AC                | ACBI              | ACBII              |       |         |
| pH                                     | 6.35              | 6.45              | 6.51               | 0.030 | 0.10    |
| VFA, mmol/L                            | 80.5              | 88.8              | 95.7               | 4.3   | 0.35    |
| Acetate                                | 59.1              | 64.1              | 69.1               | 3.2   | 0.45    |
| Propionate                             | 13.3              | 16.3              | 15.5               | 0.73  | 0.24    |
| Isobutyrate                            | 0.38              | 0.62              | 0.53               | 0.052 | 0.18    |
| Butyrate                               | 7.0               | 6.9               | 9.2                | 0.61  | 0.23    |
| Isovalerate                            | 0.60              | 0.54              | 0.67               | 0.063 | 0.68    |
| Valerate                               | 0.74              | 0.89              | 1.05               | 0.071 | 0.23    |
| Acetate:propionate                     | 4.44              | 3.93              | 4.46               | 0.23  | 0.38    |
| NH <sub>3</sub> -N, mg/100 mL          | 10.9              | 11.4              | 14.5               | 0.93  | 0.25    |
| Purine bases:N, μmol/mg                |                   |                   |                    |       |         |
| SAB                                    | 0.50 <sup>a</sup> | 0.71 <sup>b</sup> | 0.59 <sup>ab</sup> | 0.04  | 0.01    |
| LAB                                    | 0.66              | 0.92              | 0.75               | 0.10  | 0.23    |
| SAB and LAB                            | 0.58 <sup>a</sup> | 0.82 <sup>b</sup> | 0.67 <sup>ab</sup> | 0.06  | 0.03    |
| Microbial N flow, g/d                  |                   |                   |                    |       |         |
| SAB                                    | 19.4 <sup>b</sup> | 10.9 <sup>a</sup> | 10.9 <sup>a</sup>  | 1.6   | 0.004   |
| LAB                                    | 14.5              | 8.74              | 11.6               | 2.4   | 0.23    |
| SAB and LAB                            | 17.0 <sup>b</sup> | 9.8 <sup>a</sup>  | 11.3 <sup>a</sup>  | 1.1   | 0.001   |
| Microbial N/OM intake, g/kg            |                   |                   |                    |       |         |
| SAB                                    | 25.2 <sup>b</sup> | 15.1 <sup>a</sup> | 13.3 <sup>a</sup>  | 1.3   | 0.008   |
| LAB                                    | 18.6              | 11.7              | 14.6               | 2.6   | 0.21    |
| SAB and LAB                            | 21.9 <sup>b</sup> | 13.4 <sup>a</sup> | 14.0 <sup>a</sup>  | 1.8   | <0.001  |
| Microbial N/digestible OM intake, g/kg |                   |                   |                    |       |         |
| SAB                                    | 36.0 <sup>b</sup> | 20.5 <sup>a</sup> | 17.6 <sup>a</sup>  | 1.4   | 0.005   |
| LAB                                    | 26.7              | 15.9              | 18.4               | 3.4   | 0.10    |
| SAB and LAB                            | 31.4 <sup>b</sup> | 18.2 <sup>a</sup> | 18.0 <sup>a</sup>  | 1.4   | <0.001  |

<sup>a,b</sup>Within a row means not bearing a common superscript letter differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>AC = 600 g of alfalfa hay and 400 g of concentrate; ACBI = 600 g of alfalfa hay, 200 g of concentrate, and 180 ± 80 g of feed block I; ACBII = 600 g of alfalfa hay, 200 g of concentrate, and 291 ± 61 g of feed block II (fresh matter basis).

<sup>2</sup>SAB = solid-associated bacteria; LAB = liquid-associated bacteria; SAB and LAB = solid and liquid associated bacteria.

only by diet when it was estimated by using EB as the reference pellet. Differences were found between diets AC and ACBII.

Total N ( $P = 0.02$ ), NH<sub>3</sub>-N ( $P = 0.005$ ), and NAN flows ( $P = 0.02$ ) were affected by diet (Table 4). The least total N and NAN values were observed for fermenters administered diet ACBI when compared with the AC and ACBII diets. A significant effect of diet on MNF was found regardless of the bacterial pellet used as the reference for estimations ( $P = 0.01$  for SAB,  $P = 0.03$  for LAB,  $P < 0.001$  for EB, and  $P = 0.04$  for the average SAB and LAB value). With SAB and the average of SAB and LAB, greater values were found for diet ACBII in comparison with ACBI, whereas diets AC and ACBI promoted similar ( $P \geq 0.05$ ) MNF values. With EB, the MNF values for diets AC and ACBI were similar and were less ( $P < 0.001$ ) than those for diet ACBII. When comparing diets including FB (ACBI and ACBII), greater ( $P < 0.05$ ) MNF was found for diet ACBII regardless of which bacterial pellet was used as the reference. Dietary N degradation, calculated from the MNF estimated by using different bacterial pellets, was not affected ( $P \geq 0.06$ ) by diet. The efficiency of microbial growth, expressed as milligrams of microbial N per gram of digested carbohydrate, was only affected by diet ( $P = 0.01$ ) when MNF was estimated by using

EB as a reference. The greatest values were observed for diet ACBII compared with those observed for AC and ACBI, which were similar. However, when efficiency was expressed as milligrams of microbial N per kilogram of OM intake, the effect of diet was detected not only in estimations made by using EB as the reference ( $P < 0.001$ ), but also in those obtained by using SAB ( $P = 0.004$ ) and the average of SAB and LAB ( $P = 0.02$ ). Values for fermenters given diet ACBII were greater than for those given diets AC and ACBI, which were similar ( $P \geq 0.05$ ) except when values were estimated from the average of SAB and LAB. When microbial growth efficiency was expressed as milligrams of microbial N per kilogram of true digested OM diet, the only affected ( $P = 0.01$ ) values were those estimated from SAB, with smaller values found in fermenters fed diet ACBI compared with ACBII. However, the values obtained with diet AC were similar ( $P \geq 0.05$ ) to those obtained with diets ACBI and ACBII.

The DM, OM, and N contents in bacterial pellets (Table 5) were affected ( $P < 0.001$ ) by diet. Diet also affected adenine ( $P = 0.008$ ), guanine ( $P = 0.02$ ), and total PB ( $P = 0.01$ ) contents as well as PB:N ratios ( $P < 0.001$ ). Adenine, guanine, and total PB values were similar for diets ACBI and ACBII, which were greater than those found in pellets from fermenters fed diet

**Table 3.** Average values of pH, VFA production, molar proportions of VFA, carbohydrate digestibility, and efficiency of VFA production in single-flow continuous-culture fermenters fed the experimental diets<sup>1</sup>

| Item <sup>2</sup>                  | Diet               |                     |                    | SEM   | P-value |
|------------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------|---------|
|                                    | AC                 | ACBI                | ACBII              |       |         |
| pH                                 | 5.96 <sup>a</sup>  | 5.78 <sup>a</sup>   | 6.29 <sup>b</sup>  | 0.038 | <0.001  |
| Total VFA, mmol/d                  | 89.1               | 94.6                | 88.8               | 4.0   | 0.86    |
| Molar proportion, mol/100 mol      |                    |                     |                    |       |         |
| Acetate                            | 51.5               | 57.2                | 54.8               | 1.3   | 0.22    |
| Propionate                         | 29.0 <sup>b</sup>  | 25.6 <sup>ab</sup>  | 21.9 <sup>a</sup>  | 0.87  | 0.01    |
| Isobutyrate                        | 0.172              | 0.218               | 0.328              | 0.028 | 0.08    |
| Butyrate                           | 17.0               | 14.6                | 19.9               | 0.97  | 0.01    |
| Isovalerate                        | 0.581              | 0.603               | 0.865              | 0.082 | 0.30    |
| Valerate                           | 1.81               | 1.82                | 2.09               | 0.13  | 0.61    |
| Acetate:propionate                 | 1.74 <sup>a</sup>  | 2.23 <sup>ab</sup>  | 2.50 <sup>b</sup>  | 0.11  | 0.03    |
| Carbohydrate digestibility, g/g    | 0.469 <sup>a</sup> | 0.483 <sup>ab</sup> | 0.517 <sup>b</sup> | 0.021 | 0.05    |
| VFA, mmol/g digested carbohydrates | 4.22               | 4.60                | 3.95               | 0.15  | 0.75    |
| Purine bases:N, $\mu$ mol/mg       |                    |                     |                    |       |         |
| SAB                                | 0.60 <sup>a</sup>  | 0.79 <sup>c</sup>   | 0.69 <sup>b</sup>  | 0.02  | <0.001  |
| LAB                                | 0.89 <sup>a</sup>  | 1.19 <sup>b</sup>   | 1.02 <sup>ab</sup> | 0.08  | 0.04    |
| EB                                 | 1.08 <sup>a</sup>  | 1.26 <sup>b</sup>   | 1.05 <sup>a</sup>  | 0.04  | 0.002   |
| SAB and LAB                        | 0.74 <sup>a</sup>  | 0.99 <sup>b</sup>   | 0.86 <sup>ab</sup> | 0.04  | 0.002   |
| True dietary OM digestibility, g/g |                    |                     |                    |       |         |
| SAB                                | 0.48               | 0.49                | 0.52               | 0.018 | 0.71    |
| LAB                                | 0.38               | 0.38                | 0.44               | 0.019 | 0.42    |
| EB                                 | 0.34 <sup>a</sup>  | 0.37 <sup>ab</sup>  | 0.45 <sup>b</sup>  | 0.028 | 0.01    |
| SAB and LAB                        | 0.42               | 0.43                | 0.47               | 0.018 | 0.50    |

<sup>a,b</sup>Within a row means not bearing a common superscript letter differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>AC = 45 g of alfalfa hay and 30 g of concentrate; ACBI = 45 g of alfalfa hay, 15 g of concentrate, and 15 g of feed block I; ACBII = 45 g of alfalfa hay, 15 g of concentrate, and 15 g of feed block II (fresh matter basis).

<sup>2</sup>SAB = solid associated bacteria; LAB = liquid associated bacteria; EB = effluent bacteria; SAB and LAB = average value of SAB and LAB.

AC. With the exception of N ( $P = 0.11$ ), composition was affected ( $P < 0.001$ ) by the type of pellet. A diet  $\times$  pellet interaction was detected for DM ( $P < 0.001$ ), OM ( $P < 0.001$ ), and N ( $P = 0.008$ ) contents. The DM contents of both SAB and LAB were similar for all the experimental diets, whereas EB showed similar DM values for diets AC and ACBI, which were less compared with diet ACBII. The greatest OM content in SAB was found for diet AC, then for ACBI, and finally for diet ACBII. In LAB, the OM content was similar for diets AC and ACBII, with greater values than those found for diet ACBI. The OM content of EB was the least for diet ACBI. The N content of SAB was the greatest for diet AC, then for ACBI, and finally for ACBII. In LAB, the N content was similar for diets AC and ACBII, with greater values than those found for diet ACBI. The N in EB was greater for diet AC than for diets ACBI and ACBII, which showed similar values. With all the diets, the least values for adenine, guanine, and the PB:N ratio were found in SAB.

### *In Vivo-In Vitro Comparisons*

When comparing fermentation values obtained in the rumen of goats and in fermenters (Table 6), an origin effect ( $P < 0.001$ ) was observed, with the exception of total VFA concentration ( $P = 0.07$ ) and isovalerate molar proportion ( $P = 0.67$ ). Some values were greater in the rumen than in fermenters, but propionate, butyrate,

and valerate molar proportions and the efficiency of microbial growth showed greater values in fermenters than in the rumen. Total VFA concentration and isovalerate molar proportion were similar ( $P \geq 0.07$ ) in the rumen and in fermenters. The type of diet affected pH ( $P < 0.001$ ), propionate and butyrate molar proportions ( $P = 0.02$ ), and microbial growth efficiency ( $P \leq 0.03$ ) regardless of the pellet used as reference. The greatest values were for diet ACBII, with the exception of acetate, propionate, and isobutyrate molar proportions, for which the greatest values were observed for diet ACBI. An origin  $\times$  diet interaction was detected for pH ( $P = 0.003$ ), propionate molar proportion ( $P = 0.02$ ), and efficiency of microbial growth ( $P < 0.001$ ). The pH values were similar ( $P \geq 0.05$ ) for diets AC and ACBI, regardless of the origin, unlike diet ACBII, for which values were similar to those of only diets AC and ACBI in the rumen. The propionate molar proportions were similar ( $P \geq 0.05$ ) in the rumen of goats for all the diets, whereas in fermenters, values for diets AC and ACBII were different. The efficiency of microbial growth showed the greatest values for diet AC in the rumen, whereas in fermenters, the greatest values were found for diet ACBII.

In Table 7, the SAB composition in both rumen and fermenters is compared. An effect of origin ( $P < 0.001$ ) was observed, with the exception of concentrations of guanine ( $P = 0.87$ ) and total PB ( $P = 0.06$ ). Values found in fermenters were greater than in the rumen,

**Table 4.** Nitrogen metabolism in single-flow continuous-culture fermenters fed the experimental diets<sup>1</sup>

| Item <sup>2</sup>   | Diet                |                    |                    | SEM   | P-value |
|---|---------------------|--------------------|--------------------|-------|---------|
|   | AC                  | ACBI               | ACBII              |       |         |
| Flow, mg/d  |                     |                    |                    |       |         |
| Total N   | 1,817 <sup>b</sup>  | 1,545 <sup>a</sup> | 1,817 <sup>b</sup> | 32    | 0.02    |
| NH <sub>3</sub> -N  | 49.5 <sup>b</sup>   | 37.1 <sup>ab</sup> | 28.7 <sup>a</sup>  | 1.8   | 0.005   |
| Non-NH <sub>3</sub> -N  | 1,767 <sup>b</sup>  | 1,508 <sup>a</sup> | 1,788 <sup>b</sup> | 32    | 0.02    |
| Microbial N   |                     |                    |                    |       |         |
| SAB   | 1,423 <sup>ab</sup> | 1,274 <sup>a</sup> | 1,711 <sup>b</sup> | 97    | 0.01    |
| LAB   | 1,026 <sup>b</sup>  | 863 <sup>a</sup>   | 1,181 <sup>b</sup> | 34    | 0.03    |
| EB  | 783 <sup>a</sup>    | 795 <sup>a</sup>   | 1,135 <sup>b</sup> | 48    | <0.001  |
| SAB and LAB   | 1,171 <sup>ab</sup> | 1,020 <sup>a</sup> | 1,392 <sup>b</sup> | 64    | 0.04    |
| Dietary N degradation, g/g  |                     |                    |                    |       |         |
| SAB   | 0.80                | 0.87               | 0.96               | 0.14  | 0.36    |
| LAB   | 0.58                | 0.63               | 0.65               | 0.054 | 0.83    |
| EB  | 0.44                | 0.59               | 0.62               | 0.031 | 0.06    |
| SAB and LAB   | 0.66                | 0.729              | 0.77               | 0.049 | 0.61    |
| Efficiency of microbial growth, g of microbial N/kg of digested carbohydrates |                     |                    |                    |       |         |
| SAB   | 70.2                | 62.0               | 79.5               | 4.5   | 0.13    |
| LAB   | 51.8                | 41.9               | 54.9               | 4.0   | 0.25    |
| EB  | 38.2 <sup>a</sup>   | 39.0 <sup>a</sup>  | 52.5 <sup>b</sup>  | 2.5   | 0.01    |
| SAB and LAB   | 58.6                | 49.6               | 64.7               | 4.0   | 0.15    |
| Efficiency of microbial growth, g of microbial N/kg of OM intake              |                     |                    |                    |       |         |
| SAB   | 24.5 <sup>a</sup>   | 23.2 <sup>a</sup>  | 31.2 <sup>b</sup>  | 0.95  | 0.004   |
| LAB   | 17.6                | 15.7               | 21.5               | 1.16  | 0.11    |
| EB  | 13.5 <sup>a</sup>   | 14.4 <sup>a</sup>  | 20.7 <sup>b</sup>  | 0.52  | <0.001  |
| SAB and LAB   | 20.2 <sup>ab</sup>  | 18.5 <sup>a</sup>  | 25.4 <sup>b</sup>  | 0.96  | 0.02    |
| Efficiency of microbial growth, g of microbial N/kg of true digested OM       |                     |                    |                    |       |         |
| SAB   | 51.0 <sup>ab</sup>  | 47.8 <sup>a</sup>  | 59.9 <sup>b</sup>  | 0.84  | 0.01    |
| LAB   | 46.0                | 41.8               | 48.8               | 0.91  | 0.64    |
| EB  | 40.1                | 40.0               | 46.1               | 0.66  | 0.09    |
| SAB and LAB   | 48.0                | 44.5               | 53.8               | 0.86  | 0.74    |

<sup>a,b</sup>Within a row means not bearing a common superscript letter differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>AC = 45 g of alfalfa hay and 30 g of concentrate; ACBI = 45 g of alfalfa hay, 15 g of concentrate, and 15 g of feed block I; ACBII = 45 g of alfalfa hay, 15 g of concentrate, and 15 g of feed block II (fresh matter basis).

<sup>2</sup>SAB = solid associated bacteria; LAB = liquid associated bacteria; EB = effluent bacteria; SAB and LAB = average value of SAB and LAB.

with the exception of guanine, which was similar in rumen and fermenters. Diet affected ( $P \leq 0.03$ ) SAB composition. The greatest DM, OM, and N contents were observed for diet AC, whereas SAB from fermenters fed diet ACBI showed the greatest adenine, guanine, and total PB contents and PB:N ratios. An origin  $\times$  diet interaction was detected for OM ( $P < 0.001$ ) and N ( $P = 0.01$ ). The OM content was greater for fermenters than in the rumen with diets AC and ACBI, but not with diet ACBII. The N content was greater for fermenters than in the rumen with diets AC and ACBII, but not with diet ACBI.

The composition of LAB in the rumen and in fermenters is shown in Table 8. There was an effect ( $P < 0.001$ ) of bacterial pellet origin, with the exception of DM ( $P = 0.93$ ). When significant differences were found, the values were greater for pellets isolated from fermenter contents in comparison with those from the rumen, with the exception of OM, which showed greater ( $P < 0.001$ ) values for pellets from the rumen. Diet affected ( $P \leq 0.03$ ) LAB composition, with the exception of DM ( $P = 0.41$ ) and N ( $P = 0.29$ ). Adenine concentration in LAB showed the greatest values for diet ACBI, whereas the greatest guanine value was for

diet ACBII. The total PB content was similar for diets ACBI and ACBII, with greater values than for diet AC. The greatest PB:N ratio of LAB was for diet ACBI. An origin  $\times$  diet interaction was detected for DM and OM ( $P < 0.001$ ) and for N ( $P = 0.02$ ). The DM content was similar ( $P \geq 0.05$ ) in LAB from rumen and fermenters given diets AC and ACBI, but not when given diet ACBII ( $P < 0.05$ ). The OM content in the rumen was similar ( $P \geq 0.05$ ) for diets AC and ACBI, whereas in fermenters, it was similar ( $P \geq 0.05$ ) for diets AC and ACBII. The least values for N content in LAB from the rumen were found for diet ACBII, whereas in LAB from fermenters, the least values were observed with diet ACBI.

## DISCUSSION

The shortage of cereals for animal feeding obligates animal nutritionists to look for locally available alternative sources of nutrients. Feed blocks may allow for decreased use of concentrate and cereals in animal nutrition. The use of FB may also allow for the integration of by-products, especially those with high moisture, thereby permitting recycling and decreased



**Table 5.** Chemical composition of solid-associated bacteria (SAB) and liquid-associated bacteria (LAB) isolated from the fermenter contents and from effluents (EB) in single-flow continuous-culture fermenters fed the experimental diets<sup>1</sup>

| Item                       | Diet              |                     |                    |                     |                    |                    |                    |                     |                    |       |          |            | P-value |       |
|----------------------------|-------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------|----------|------------|---------|-------|
|                            | AC                |                     |                    | ACBI                |                    |                    | ACBII              |                     |                    | SEM   | Diet (D) | Pellet (P) |         | D × P |
|                            | SAB               | LAB                 | EB                 | SAB                 | LAB                | EB                 | SAB                | LAB                 | EB                 |       |          |            |         |       |
| DM, g/g of fresh matter    | 0.92 <sup>c</sup> | 0.86 <sup>ab</sup>  | 0.83 <sup>a</sup>  | 0.91 <sup>c</sup>   | 0.86 <sup>ab</sup> | 0.83 <sup>a</sup>  | 0.91 <sup>c</sup>  | 0.88 <sup>bc</sup>  | 0.87 <sup>bc</sup> | 0.002 | <0.001   | <0.001     | 0.001   |       |
| OM, g/g of DM              | 0.87 <sup>c</sup> | 0.75 <sup>ab</sup>  | 0.70 <sup>ab</sup> | 0.79 <sup>bc</sup>  | 0.66 <sup>a</sup>  | 0.67 <sup>a</sup>  | 0.64 <sup>a</sup>  | 0.74 <sup>ab</sup>  | 0.74 <sup>ab</sup> | 0.004 | <0.001   | <0.001     | <0.001  |       |
| Total N, mg/g of DM        | 78.9 <sup>b</sup> | 76.9 <sup>ab</sup>  | 75.0 <sup>ab</sup> | 70.9 <sup>ab</sup>  | 70.4 <sup>ab</sup> | 71.9 <sup>ab</sup> | 69.3 <sup>a</sup>  | 77.6 <sup>ab</sup>  | 70.3 <sup>ab</sup> | 0.59  | <0.001   | 0.11       | 0.008   |       |
| Purine bases, µmol/g of DM |                   |                     |                    |                     |                    |                    |                    |                     |                    |       |          |            |         |       |
| Adenine                    | 16.8 <sup>a</sup> | 30.1 <sup>bcd</sup> | 35.4 <sup>d</sup>  | 22.3 <sup>abc</sup> | 37.0 <sup>d</sup>  | 40.5 <sup>d</sup>  | 19.9 <sup>ab</sup> | 36.4 <sup>d</sup>   | 32.3 <sup>cd</sup> | 2.3   | 0.008    | <0.001     | 0.36    |       |
| Guanine                    | 21.6 <sup>a</sup> | 38.4 <sup>bc</sup>  | 45.5 <sup>c</sup>  | 27.6 <sup>ab</sup>  | 45.7 <sup>c</sup>  | 49.5 <sup>c</sup>  | 25.8 <sup>a</sup>  | 46.4 <sup>c</sup>   | 41.3 <sup>c</sup>  | 2.5   | 0.02     | <0.001     | 0.22    |       |
| Total                      | 38.4 <sup>a</sup> | 68.5 <sup>bc</sup>  | 81.0 <sup>c</sup>  | 50.0 <sup>ab</sup>  | 82.7 <sup>c</sup>  | 89.8 <sup>c</sup>  | 45.7 <sup>b</sup>  | 82.8 <sup>c</sup>   | 73.6 <sup>c</sup>  | 4.7   | 0.01     | <0.001     | 0.26    |       |
| Purine bases:N, µmol/mg    | 0.60 <sup>a</sup> | 0.89 <sup>bcd</sup> | 1.08 <sup>cd</sup> | 0.79 <sup>abc</sup> | 1.19 <sup>e</sup>  | 1.26 <sup>e</sup>  | 0.69 <sup>ab</sup> | 1.02 <sup>cde</sup> | 1.05 <sup>de</sup> | 0.028 | <0.001   | <0.001     | 0.42    |       |

<sup>a-c</sup>Within a row means not bearing a common superscript letter differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>AC = 45 g of alfalfa hay and 30 g of concentrate; ACBI = 45 g of alfalfa hay, 15 g of concentrate, and 15 g of feed block I; ACBII = 45 g of alfalfa hay, 15 g of concentrate, and 15 g of feed block II (fresh matter basis).

feeding cost. End users often ask what quantity of FB can be used to reduce feeding cost and increase income from sheep and goat products. Block intake by goats in the present study was  $180 \pm 80$  and  $291 \pm 61$  g/d for diets ACBI and ACBII, respectively. These intake values were greater than those found by Gasmi-Boubaker et al. (2006) using FB with grazing goats. The concentrate cost for diet AC was approximately 0.10 euros/d and the cost for concentrate plus FB in diets ACBI and ACBII was 0.09 and 0.15 euros/d, respectively, representing a 10% decrease in the cost for diet ACBI in comparison with diet AC. Houmani and Tisserand (1999) reported that the cost decreased from 12 to 23% on replacement of 75% of the concentrate with molasses-free or molasses-containing blocks, with similar growth rates observed in animals fed the full amount of concentrate and blocks. In lambs fed barley straw supplemented with blocks based on 3-stage olive cake, Ben Salem and Nefzaoui (2003) reported that the daily BW gain cost decreased by 18% compared with animals given barley straw and 500 g of concentrate. El Hag et al. (2002) found that it was economically viable to use FB-containing by-products and urea for sheep and goats because the cost per kilogram of grain was reduced by 38% as compared with the control diet (grass hay and concentrate).

The inclusion of high-moisture by-products such as CTSOC in ruminant diets is challenging, but might help to prevent environmental pollution. The CTSOC could offer an additional advantage based on the presence of polyphenols (37.3 g of condensed tannins/kg of DM) and fat (100 g of ether extract/kg of DM) rich in fatty acids, such as oleic (70.1%) and linoleic (9.5%) acids. Biohydrogenation of these fatty acids in the rumen produces CLA (Jenkins et al., 2008), which are considered healthy for consumers (Pariza, 2004). Inclusion of this by-product in animal feed might thus enhance animal product quality.

Almost no information is available regarding the effect of FB on rumen fermentation. Feed blocks have been used as a supplement to improve poor roughage utilization in goats (Samanta et al., 2003) without affecting VFA, in agreement with our observations both in vivo and in vitro. The absence of differences in VFA concentration among animals or fermenters given the different experimental diets, together with the absence of effects of diet on in vitro VFA production, suggest that partial substitution of the concentrate with either of the 2 studied FB does not compromise ruminal carbohydrate fermentation. Rumen concentrations of VFA in the present study with all the experimental diets were similar to those reported by Lu et al. (1990) in lactating dairy goats fed a diet containing soybean meal. Varying results have been reported for VFA production efficiency. Dann et al. (2006) reported 11.8 mol of VFA/kg of digested carbohydrate; this value is much greater than ours.

Complete FB including roughage have been used by Bhatta et al. (2005), who found decreased  $\text{NH}_3$  con-

**Table 6.** Average values of pH, VFA concentration, acetate:propionate ratio, NH<sub>3</sub>-N concentration, and efficiency of microbial N synthesis in the rumen of goats and in single-flow continuous-culture fermenters fed the experimental diets<sup>1</sup>

| Item <sup>2</sup>  | Origin              |                    |                    |                    |                     |                     | SEM   | <i>P</i> -value |          |        |
|--|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-------|-----------------|----------|--------|
|  | Rumen               |                    |                    | Fermenter          |                     |                     |       | Origin (O)      | Diet (D) | O × D  |
|  | AC                  | ACBI               | ACBII              | AC                 | ACBI                | ACBII               |       |                 |          |        |
| pH   | 6.35 <sup>b</sup>   | 6.45 <sup>b</sup>  | 6.51 <sup>b</sup>  | 5.96 <sup>a</sup>  | 5.78 <sup>a</sup>   | 6.29 <sup>b</sup>   | 0.024 | <0.001          | <0.001   | 0.003  |
| Total VFA, mmol/L  | 80.5                | 88.8               | 95.7               | 89.1               | 94.6                | 88.8                | 2.8   | 0.07            | 0.34     | 0.73   |
| Molar proportion, mol/100 mol                                    |                     |                    |                    |                    |                     |                     |       |                 |          |        |
| Acetate  | 73.4 <sup>b</sup>   | 72.2 <sup>b</sup>  | 72.2 <sup>b</sup>  | 51.5 <sup>a</sup>  | 57.2 <sup>a</sup>   | 54.8 <sup>a</sup>   | 0.70  | <0.001          | 0.43     | 0.14   |
| Propionate   | 16.5 <sup>a</sup>   | 18.4 <sup>a</sup>  | 16.2 <sup>a</sup>  | 29.0 <sup>c</sup>  | 25.6 <sup>bc</sup>  | 21.9 <sup>ab</sup>  | 0.53  | <0.001          | 0.02     | 0.02   |
| Isobutyrate  | 0.47 <sup>bcd</sup> | 0.70 <sup>d</sup>  | 0.56 <sup>cd</sup> | 0.17 <sup>a</sup>  | 0.22 <sup>ab</sup>  | 0.33 <sup>abc</sup> | 0.024 | <0.001          | 0.07     | 0.20   |
| Butyrate   | 8.73 <sup>ab</sup>  | 7.76 <sup>a</sup>  | 9.66 <sup>ab</sup> | 17.0 <sup>cd</sup> | 14.6 <sup>bc</sup>  | 19.9 <sup>d</sup>   | 0.51  | <0.001          | 0.02     | 0.26   |
| Isovalerate  | 0.75                | 0.61               | 0.70               | 0.58               | 0.60                | 0.87                | 0.055 | 0.67            | 0.28     | 0.31   |
| Valerate   | 0.92 <sup>a</sup>   | 1.00 <sup>ab</sup> | 1.09 <sup>ab</sup> | 1.81 <sup>bc</sup> | 1.82 <sup>bc</sup>  | 2.09 <sup>c</sup>   | 0.074 | <0.001          | 0.38     | 0.87   |
| Acetate:propionate   | 4.44 <sup>b</sup>   | 3.93 <sup>b</sup>  | 4.46 <sup>b</sup>  | 1.78 <sup>a</sup>  | 2.23 <sup>a</sup>   | 2.50 <sup>a</sup>   | 0.095 | <0.001          | 0.17     | 0.10   |
| NH <sub>3</sub> N, mg/100 mL                                     | 10.9 <sup>b</sup>   | 11.4 <sup>b</sup>  | 14.5 <sup>b</sup>  | 5.1 <sup>a</sup>   | 3.8 <sup>a</sup>    | 3.1 <sup>a</sup>    | 0.42  | <0.001          | 0.44     | 0.05   |
| Efficiency of microbial growth, g of microbial N/kg of OM intake |                     |                    |                    |                    |                     |                     |       |                 |          |        |
| SAB  | 25.2 <sup>b</sup>   | 15.1 <sup>a</sup>  | 13.3 <sup>a</sup>  | 24.5 <sup>b</sup>  | 23.2 <sup>b</sup>   | 31.2 <sup>c</sup>   | 0.54  | <0.001          | <0.001   | <0.001 |
| LAB  | 18.6 <sup>bc</sup>  | 11.7 <sup>a</sup>  | 14.6 <sup>ab</sup> | 17.6 <sup>c</sup>  | 15.7 <sup>abc</sup> | 21.5 <sup>c</sup>   | 0.64  | <0.001          | 0.03     | <0.001 |
| SAB and LAB  | 21.9 <sup>b</sup>   | 12.5 <sup>a</sup>  | 13.8 <sup>a</sup>  | 20.2 <sup>bc</sup> | 18.5 <sup>b</sup>   | 25.4 <sup>c</sup>   | 0.53  | <0.001          | 0.02     | <0.001 |

<sup>a-d</sup>Within a row means not bearing a common superscript letter differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>AC = 600 g of alfalfa hay and 400 g of concentrate; ACBI = 600 g of alfalfa hay, 200 g of concentrate, and 180 ± 80 g of feed block I; ACBII = 600 g of alfalfa hay, 200 g of concentrate, and 291 ± 61 g of feed block II (fresh matter basis for in vivo experiments), and AC = 45 g of alfalfa hay and 30 g of concentrate; ACBI = 45 g of alfalfa hay, 15 g of concentrate, and 15 g of feed block I; ACBII = 45 g of alfalfa hay, 15 g of concentrate, and 15 g of feed block II (fresh matter basis for in vitro experiments).

<sup>2</sup>SAB = solid-associated bacteria; LAB = liquid-associated bacteria; SAB and LAB = average value from both pellets.

concentrations in the rumen than we found in the present experiments (5.4 vs. 7.9 mg/dL). The NH<sub>3</sub>-N concentrations in the present work were similar to those reported by Lu et al. (1990) in lactating dairy goats fed a diet containing soybean meal. The in vivo and in vitro results in this study were different; no effect of diet on NH<sub>3</sub> was observed in vivo, whereas in vitro NH<sub>3</sub> production in fermenters given diet ACBII was less than that in fermenters given diets AC and ACBI. Although no differences were found for NH<sub>3</sub> concentration in the goat rumen, both MNF and efficiency were significantly

greater in animals fed diet AC as compared with those fed diets ACBI and ACBII when using SAB or an average of SAB and LAB as a reference. This suggests that partial substitution of concentrate with blocks might compromise rumen N metabolism. Because blocks I and II produced the same results but the price was less for block I, its use may be more highly recommended. However, this pattern did not appear in vitro because the MNF in fermenters given diet ACBII was not less than that in fermenters receiving diet AC, regardless of which bacterial pellet was used as the reference.

**Table 7.** Composition of solid-associated bacteria (SAB) isolated from the rumen of goats and from the content of single-flow continuous-culture fermenters fed the experimental diets<sup>1</sup>

| Item                         | Origin             |                    |                    |                    |                    |                    | SEM    | <i>P</i> -value |          |        |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------|-----------------|----------|--------|
|                              | Rumen              |                    |                    | Fermenter          |                    |                    |        | Origin (O)      | Diet (D) | O × D  |
|                              | AC                 | ACBI               | ACBII              | AC                 | ACBI               | ACBII              |        |                 |          |        |
| DM, g/g of fresh matter      | 0.89 <sup>ab</sup> | 0.87 <sup>a</sup>  | 0.88 <sup>a</sup>  | 0.92 <sup>c</sup>  | 0.91 <sup>bc</sup> | 0.91 <sup>bc</sup> | 0.0025 | <0.001          | 0.03     | 0.64   |
| OM, g/g of DM                | 0.75 <sup>c</sup>  | 0.70 <sup>b</sup>  | 0.70 <sup>b</sup>  | 0.87 <sup>d</sup>  | 0.79 <sup>c</sup>  | 0.64 <sup>a</sup>  | 0.0035 | <0.001          | <0.001   | <0.001 |
| Total N, mg/g of DM          | 67.5 <sup>b</sup>  | 67.0 <sup>b</sup>  | 59.9 <sup>a</sup>  | 78.9 <sup>c</sup>  | 70.9 <sup>b</sup>  | 69.3 <sup>b</sup>  | 0.52   | <0.001          | <0.001   | 0.01   |
| Purine bases, μmol/g of DM   |                    |                    |                    |                    |                    |                    |        |                 |          |        |
| Adenine                      | 11.9 <sup>a</sup>  | 17.4 <sup>ab</sup> | 11.7 <sup>a</sup>  | 16.8 <sup>ab</sup> | 22.3 <sup>b</sup>  | 19.9 <sup>b</sup>  | 0.67   | <0.001          | 0.005    | 0.51   |
| Guanine                      | 21.2 <sup>a</sup>  | 31.5 <sup>b</sup>  | 23.0 <sup>a</sup>  | 21.6 <sup>a</sup>  | 27.6 <sup>ab</sup> | 25.8 <sup>ab</sup> | 0.80   | 0.87            | 0.001    | 0.24   |
| Total                        | 33.1 <sup>a</sup>  | 48.9 <sup>b</sup>  | 34.8 <sup>a</sup>  | 38.4 <sup>ab</sup> | 49.9 <sup>b</sup>  | 45.7 <sup>ab</sup> | 1.5    | 0.06            | 0.002    | 0.38   |
| Purine bases:N, μmol/mg of N | 0.49 <sup>a</sup>  | 0.73 <sup>c</sup>  | 0.58 <sup>ab</sup> | 0.60 <sup>ab</sup> | 0.79 <sup>c</sup>  | 0.69 <sup>bc</sup> | 0.025  | <0.001          | <0.001   | 0.58   |

<sup>a-d</sup>Within a row means not bearing a common superscript letter differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>AC = 600 g of alfalfa hay and 400 g of concentrate; ACBI = 600 g of alfalfa hay, 200 g of concentrate, and 180 ± 79.7 g of feed block I; ACBII = 600 g of alfalfa hay, 200 g of concentrate, and 291 ± 60.9 g of feed block II (fresh matter basis for in vivo experiments), and AC = 45 g of alfalfa hay and 30 g of concentrate; ACBI = 45 g of alfalfa hay, 15 g of concentrate, and 15 g of feed block I; ACBII = 45 g of alfalfa hay, 15 g of concentrate, and 15 g of feed block II (fresh matter basis for in vitro experiments).

**Table 8.** Composition of liquid-associated bacteria (LAB) isolated from the rumen of goats and from fermenters content of single-flow continuous-culture fermenters fed the experimental diets<sup>1</sup>

| Item                         | Origin             |                     |                    |                    |                     |                    | SEM   | <i>P</i> -value |          |        |
|------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------|-----------------|----------|--------|
|                              | Rumen              |                     |                    | Fermenter          |                     |                    |       | Origin (O)      | Diet (D) | O × D  |
|                              | AC                 | ACBI                | ACBII              | AC                 | ACBI                | ACBII              |       |                 |          |        |
| DM, g/g of fresh matter      | 0.88 <sup>b</sup>  | 0.88 <sup>b</sup>   | 0.84 <sup>a</sup>  | 0.86 <sup>ab</sup> | 0.86 <sup>ab</sup>  | 0.88 <sup>b</sup>  | 0.003 | 0.93            | 0.41     | <0.001 |
| OM, g/g of DM                | 0.82 <sup>d</sup>  | 0.83 <sup>d</sup>   | 0.79 <sup>c</sup>  | 0.75 <sup>b</sup>  | 0.66 <sup>a</sup>   | 0.74 <sup>b</sup>  | 0.005 | <0.001          | 0.03     | <0.001 |
| Total N, mg/g of DM          | 68.6 <sup>ab</sup> | 70.7 <sup>abc</sup> | 68.0 <sup>a</sup>  | 76.9 <sup>bc</sup> | 70.4 <sup>abc</sup> | 77.6 <sup>c</sup>  | 0.78  | <0.001          | 0.29     | 0.02   |
| Purine bases, μmol/g of DM   |                    |                     |                    |                    |                     |                    |       |                 |          |        |
| Adenine                      | 16.6 <sup>a</sup>  | 21.6 <sup>ab</sup>  | 20.8 <sup>ab</sup> | 30.1 <sup>bc</sup> | 37.0 <sup>c</sup>   | 36.4 <sup>c</sup>  | 0.92  | <0.001          | 0.03     | 0.90   |
| Guanine                      | 28.4 <sup>a</sup>  | 38.0 <sup>ab</sup>  | 38.9 <sup>ab</sup> | 38.4 <sup>ab</sup> | 45.7 <sup>b</sup>   | 46.4 <sup>b</sup>  | 1.1   | 0.001           | 0.003    | 0.78   |
| Total                        | 45.1 <sup>a</sup>  | 59.6 <sup>ab</sup>  | 59.7 <sup>ab</sup> | 68.5 <sup>bc</sup> | 82.7 <sup>c</sup>   | 82.8 <sup>c</sup>  | 1.9   | <0.001          | 0.006    | 0.96   |
| Purine bases:N, μmol/mg of N | 0.66 <sup>a</sup>  | 0.83 <sup>ab</sup>  | 0.90 <sup>ab</sup> | 0.89 <sup>ab</sup> | 1.19 <sup>c</sup>   | 1.02 <sup>bc</sup> | 0.025 | <0.001          | 0.001    | 0.16   |

<sup>a-d</sup>Within a row means not bearing a common superscript letter differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>AC = 600 g of alfalfa hay and 400 g of concentrate; ACBI = 600 g of alfalfa hay, 200 g of concentrate and 180 ± 80 g of feed block I; ACBII = 600 g of alfalfa hay, 200 g of concentrate and 291 ± 61 g of feed block II (fresh matter basis), and AC = 45 g of alfalfa hay and 30 g of concentrate; ACBI = 45 g of alfalfa hay, 15 g of concentrate and 15 g of feed block I; ACBII = 45 g of alfalfa hay, 15 g of concentrate and 15 g of feed block II (fresh matter basis, for in vitro experiments).

The greater efficiency for MNF in goats fed diet AC in comparison with those fed diets including blocks may indicate a better supply of available carbohydrates in diet AC, as previously suggested by Lee et al. (2003). It may also indicate increased efficiency of N use (Merry et al., 2006) in animals fed diet AC as compared with those receiving diets ACBI and ACBII. Although the most important factors influencing microbial growth are rumen outflow and energy available to microbes, growth may also be influenced by the substrate and type of microbes growing in the rumen (Van Soest et al., 1988). Dietary energy supply and synchronization between N and OM release from diets have been positively associated with the efficiency of microbial growth (Henning et al., 1993; Shabi et al., 1998). Some of our observed values for MNF and efficiency were within the range observed for ewes fed diets including soybean meal (84.0 to 92.2 g of microbial protein/d and 10.8 to 11.4 g of microbial protein/100 g of OM truly degraded in the rumen) by Karsli et al. (2006). The reduced MNF and microbial growth efficiency in animals fed diets including FB may limit the benefits of this feeding strategy. However, the high degree of variability found in the available literature concerning MNF has to be taken into account. Richardson et al. (2003) found that MNF varied from 8.2 to 14.2 g/d in lambs. Yáñez-Ruiz et al. (2004) found that the microbial protein supply to the duodenum varied from 0.50 to 1.53 in goats and from 0.49 to 0.85 g/kg<sup>0.75</sup> in sheep when both animal species were fed different diets. Cantalapiedra-Híjar et al. (2008) also found varying results (12.1 to 28.9 g/d) in goats fed diets with different forage types and forage:concentrate ratios. Dann et al. (2006) found microbial N efficiency values varying from 40.9 to 46.8 g/kg of digested OM and from 46.4 to 56.3/kg of total carbohydrate; this was similar to our results.

In agreement with other studies (Martín-Orue et al., 1998; Carro and Miller, 2002; Molina-Alcaide et al., 2008), LAB were found to contain greater concentra-

tions of both adenine and guanine, in addition to exhibiting a greater PB:N ratio than SAB, both in vivo and in vitro. Although Rodríguez-Prado et al. (2004) also found less PB in SAB than in LAB, they did not find in vitro differences in PB:N ratios between SAB and LAB. Smaller values for SAB isolated from the rumen of steers in comparison with LAB have also been reported by Cecava et al. (1990). Similar observations have been made in vitro by Molina-Alcaide et al. (2008), who used fermenters given diets composed of alfalfa hay and a concentrate including dry and extracted 2-stage olive cake. Rodríguez et al. (2000) found greater purine concentrations and PB:N ratios with LAB as compared with SAB in sheep rumen, and associated the increased amount of purines in bacteria with increased ruminal outflow. Because changes in PB concentration have been associated with the presence of different bacterial species with different growth rates (Obispo and Dehority, 1999), the decreased content of PB in SAB might be due to the decreased growth rate of the microbial population in this pellet as compared with LAB. The PB:N ratio in EB was close to that in LAB with all diets and was always greater than in SAB. This difference might be due to the effect of differences in processing (solid for isolation of SAB and total effluent for EB) on the effectiveness of detachment. As a consequence of the different marker:N ratios in SAB and LAB, the estimated MNF has been reported to be greater for SAB than for LAB (Pérez et al., 1998; Rodríguez et al., 2000; Carro and Miller, 2002; Molina-Alcaide et al., 2008).

Our in vivo and in vitro results showed smaller values for MNF and its efficiency when using LAB as compared with SAB (data not shown). The values obtained in vitro with EB were the least (data not shown) of the 3. This is difficult to explain because EB should represent a mixture of LAB and SAB in single-flow continuous-culture fermenters. The PB:N ratio of pellets did not change across diets (diet × pellet interaction);

therefore, different MNF values across diets cannot be attributed to differences in the microbial marker. Regardless of the bacterial pellet used, the MNF values of diets including FB II were always greater than those of diets including FB I. These results do not agree with those reported by Rodríguez-Prado et al. (2004), who did not find differences in bacterial N flow and efficiency for LAB and SAB isolated from fermenters inoculated with rumen liquor from cows.

Of interest for ruminant nutritionists is the possibility of simulating ruminal fermentation with in vitro techniques, thereby reducing the need for animals, especially fistulated animals. Studies comparing in vivo and in vitro results are scarce, especially with small ruminants (Carro et al., 2005, 2008). It is of interest not only to simulate rumen fermentation variables, but also to compare the chemical composition of bacterial pellets from in vivo and in vitro experiments and of pellets isolated from fermenter contents and effluents. Because EB isolated from the effluent collected over a 24-h period represents a mixed bacterial pellet, its use as a reference pellet could simplify the estimation of MNF, which requires LAB and SAB isolation. On the other hand, García et al. (2006) used  $^{15}\text{N}$  as a microbial marker for single-flow continuous-culture fermenters given 2 different diets, and reported no differences in MNF estimation between EB and mixed pellets isolated from fermenter flask contents immediately before feeding.

Our finding of greater pH values in the rumen than in fermenters agrees with the observations by Carro et al. (2008), who compared single-flow continuous-culture fermenters with the rumen of sheep. Those authors also found less  $\text{NH}_3\text{-N}$  in fermenters than in sheep rumen. The similarity of the VFA concentration between the goat rumen and fermenters agrees with the observations of Carro et al. (2008) comparing sheep rumen and fermenters. However, our comparison of goats and fermenters provides different results concerning the molar proportions of VFA. In contrast to the findings of Carro et al. (2008) with sheep, we found that acetate:propionate ratios were greater in the goat rumen than in fermenters. The buffering capacity of saliva added to the fermenters, together with differences in input diet between fermenters and goats, might explain the differences in pH and VFA concentration, although the lack of absorption in fermenters might result in the expectation of greater values in fermenters. Comparison with other results is difficult because of the different input methods used in fermenters. Changes in microbial species might be derived from changes in pH and might explain the differences in VFA when comparing in vivo and in vitro results. Almost no information is available on microbial communities in the goat rumen and in fermenters. Results obtained by our group (Cantalapiedra-Híjar et al., 2007) using denaturing gradient gel electrophoresis suggest less diversity in fermenters than in goats fed diets including alfalfa hay and concentrate at different ratios. Soto et al. (In

press) applied that methodology and real-time PCR to show that fermenters can support most rumen microorganisms, but they concluded that in vitro conditions seem to alter the quantity and diversity of bacterial communities, although these results depended on the experimental diet.

Although similar values for some of the fermentation variables have been obtained in the rumen of goats and in fermenters, the observed differences could limit the potential for simulation of the in vivo conditions used in the present study. A comparison of the composition of bacterial pellets isolated in vivo and in vitro (SAB and LAB) showed differences depending on the origin and significant origin  $\times$  diet interactions for many of the analyzed variables. However, PB:N values did not demonstrate origin  $\times$  diet interactions; this is crucial for evaluating diet effects on MNF as well. These findings suggest the potential of single-flow continuous-culture fermenters to rank diets similarly to in vivo results in terms of MNF.

Partial substitution of concentrate with FB for unproductive goats seems to be possible because notable differences were not observed in ruminal carbohydrate fermentation either in vivo or in vitro. However, in vivo differences found for MNF and its efficiency that indicate better microbial fermentation for diet AC in comparison with ACBI and ACBII may limit the potential of this feeding strategy. The use of these experimental FB and other formulae that allow optimal synchronization of energy and N should be investigated further. The promotion of better N metabolism by diet AC is not as clear in vitro. Differences between in vivo and in vitro results suggest that fermenter conditions allowing better simulation of in vivo fermentation should be investigated further.

## LITERATURE CITED

- AOAC. 1999. Official Methods of Analysis. 17th ed. Assoc. Off. Anal. Chem. Arlington, VA.
- Balcells, J., J. A. Guada, J. M. Peiró, and D. S. Parker. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 575:153–157.
- Belenguer, A., D. Yáñez, J. Balcells, N. H. Ozdemir Baber, and M. González Ronquillo. 2002. Urinary excretion of purine derivatives and prediction of rumen microbial outflow in goats. *Livest. Prod. Sci.* 77:127–135.
- Ben Salem, H., and A. Nefzaoui. 2003. Feed blocks as alternative supplements for sheep and goats. *Small Rumin. Res.* 49:275–288.
- Bhatta, R., S. Vaithyanathan, A. K. Shinde, and R. C. Jakhmola. 2005. Effect of feeding complete feed block containing *Prosopis cineraria* leaves and polyethylene glycol (PEG)-6000 on nutrient intake, its utilization, rumen fermentation pattern and rumen enzyme profile in kids. *J. Sci. Food Agric.* 85:1788–1794.
- Cantalapiedra-Híjar, G., E. Molina-Alcaide, and D. R. Yáñez-Ruiz. 2007. Bacterial diversity in goats rumen and in single-flow continuous culture fermenters analysed by DGGE. Pages 10–11 in *Avances Metodológicos en el Estudio de la Microbiología Digestiva*. Univ. Zaragoza, Spain.
- Cantalapiedra-Híjar, G., D. R. Yáñez-Ruiz, A. I. Martín-García, and E. Molina-Alcaide. 2008. Effects of forage:concentrate ratio and



- forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation and microbial growth in goats. *J. Anim. Sci.* doi:10.2527/jas.2008-1142
- Carro, M. D., and E. L. Miller. 2002. Comparison of microbial markers ( $^{15}\text{N}$  and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. *Anim. Sci.* 75:315–321.
- Carro, M. D., M. J. Ranilla, A. I. Martín-García, and E. Molina-Alcaide. 2005. Comparative study of ruminal fermentation of a high concentrate diet in sheep and two fermenters systems. *Información Técnica Económica Agraria* 26:608–610.
- Carro, M.D., M. J. Ranilla, A. I. Martín-García, and E. Molina-Alcaide. 2008. Comparison of microbial fermentation of high- and low-forage diets in sheep rumen, Rusitec and single-flow continuous-culture fermenters. *Animal* doi:10.1017/S1751731108003844
- Cecava, M. J., N. R. Merchen, L. C. Gay, and L. L. Berger. 1990. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. *J. Dairy Sci.* 73:2480–2488.
- Dann, H. M., C. S. Ballard, R. J. Grant, K. W. Cotanch, M. P. Carter, and M. Suekawa. 2006. Effects of glutamate on microbial efficiency and metabolism in continuous culture of ruminal contents and on performance of mid-lactation dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 130:204–224.
- El Hag, M. G., M. A. Al-Merza, and B. Al Salti. 2002. Growth in the Sultanate of Oman of small ruminants given date byproducts-urea multinutrient blocks. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 15:671–674.
- García, A. I. M., M. J. Ranilla, E. M. Alcaide, and M. D. Carro. 2006. Comparison of microbial pellets for estimation of microbial protein synthesis in continuous-culture fermenters. *Reprod. Nutr. Dev.* 46(Suppl. 1):S48. (Abstr.)
- Gasmí-Boubaker, A., C. Kayouli, A. Buldgen, A. Boukary, H. Ammar, and S. López. 2006. Effect of feed block supply on the ruminal ecosystem of goats grazing shrub land in Tunisia. *Anim. Feed Sci. Technol.* 127:1–12.
- Hannah, S. M., M. D. Stern, and F. R. Ehle. 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.* 16:51–52.
- Henning, P. H., D. G. Steyn, and H. H. Meissner. 1993. Effect of synchronization of energy and nitrogen supply on ruminal characteristics and microbial growth. *J. Anim. Sci.* 71:2516–2528.
- Hermoso, M., J. González, M. Uceda, A. García-Ortiz, J. Morales, L. Frias, and A. Fernández. 1995. *Elaboración de Aceites de Oliva de Calidad. Obtención por el Sistema de dos Fases*, ed. Junta de Andalucía, Sevilla, Spain.
- Houmani, M., and J. L. Tisserand. 1999. Complémentation d'une paille de blé avec des blocs multinutritionnels: Effets sur la digestibilité de la paille et intérêt pour des brebis tarées et des agneaux en croissance. *Ann. Zootech.* 48:199–209.
- Isac, M. D., M. A. García, J. F. Aguilera, and E. Molina-Alcaide. 1994. A comparative study of nutrient digestibility, kinetics of digestion and passage and rumen fermentation pattern in goats and sheep offered medium quality forages at the maintenance level of feeding. *Arch. Tierernähr.* 46:37–50.
- Jenkins, T. C., R. J. Wallace, P. J. Moate, and E. E. Mosley. 2008. Board-Invited Review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.* 86:397–412.
- Karsli, M. A., T. Tasal, and H. Nursoy. 2006. Effect of dietary inclusion of hazelnut and soybean meals on microbial protein synthesis. *Small Rumin. Res.* 64:180–185.
- Lee, M. R. F., R. J. Merry, D. R. Davies, J. M. Moorby, M. O. Humphreys, M. K. Theodorou, J. C. MacRae, and N. D. Scollan. 2003. Effect of increasing availability of water-soluble carbohydrates on in vitro rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 104:59–70.
- Lu, C. D., M. J. Potchoiba, T. Sahlu, and J. M. Fernández. 1990. Performance of dairy goats fed isonitrogenous diets containing soybean meal or hydrolyzed feather meal during early lactation. *Small Rumin. Res.* 3:425–434.
- 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.
- Martín-Orue, 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.
- McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43:99–109.
- Merry, R. J., M. R. F. Lee, D. R. Davies, R. J. Dewhurst, J. M. Moorby, N. D. Scollan, and M. K. Theodorou. 2006. Effects of high-sugar ryegrass silage and mixtures with red clover silage on ruminant digestion. 1. In vitro and in vivo studies of nitrogen utilization. *J. Anim. Sci.* 84:3049–3060.
- Michalet-Doreau, B., and M. Y. Ould-Bah. 1992. Influence of hay making on in situ nitrogen degradability of forages in cows. *J. Dairy Sci.* 75:782–788.
- Miettinen, H., and J. Setälä. 1989. Design and development of a continuous culture system to study rumen fermentation. *J. Agric. Sci. Finl.* 61:463–473.
- Molina-Alcaide, E., A. Moumen, A. 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.* doi:10.1111/j.1439-0396.2008.00834.x
- Molina-Alcaide, E., and D. R. Yáñez-Ruiz. 2008. Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147:247–264.
- Obispo, N. E., and B. A. Dehority. 1999. Feasibility of using total purines as a marker for ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.* 77:3084–3095.
- Pariza, M. W. 2004. Perspectives on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:1132S–1136S.
- Pérez, J. F., J. Balcells, J. A. Cebrían, and S. M. Martín-Orue. 1998. Excretion of endogenous and exogenous purine derivatives in sheep: Effect of increased concentrate intake. *Br. J. Nutr.* 79:237–240.
- Pérez-Maldonado, R. A., and B. W. Norton. 1996. Digestion of  $^{14}\text{C}$ -labelled condensed tannins from *Desmodium intortum* in sheep and goats. *Br. J. Nutr.* 76:501–513.
- Richardson, J. M., R. G. Wilkinson, and L. A. Sinclair. 2003. Synchrony of nutrient supply to the rumen and dietary energy source and their effects on the growth and metabolism of lambs. *J. Anim. Sci.* 81:1332–1347.
- Rodríguez, C. A., J. González, M. R. Alvir, J. L. Repetto, C. Centeno, and F. Lamrani. 2000. Composition of bacteria harvested from the liquid and solid fractions of the rumen of sheep as influenced by feed intake. *Br. J. Nutr.* 84:369–376.
- Rodríguez-Prado, M., S. Calsamiglia, and A. Ferret. 2004. Effects of fiber content and particle size of forage on the flow of microbial amino acids from continuous culture fermenters. *J. Dairy Sci.* 87:1413–1424.
- Samanta, A. K., K. K. Singh, M. M. Das, S. B. Maity, and S. S. Kundu. 2003. Effect of complete feed block on nutrient utilisation and rumen fermentation in Barbari goats. *Small Rumin. Res.* 48:95–102.
- Shabi, Z., A. Arieli, I. Bruckental, Y. Aharoni, S. Zamwel, A. Bor, and H. Tagari. 1998. Effect of the synchronization of the degradation of dietary crude protein and organic matter and feeding frequency on ruminal fermentation and flow of digesta in the abomasum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1991–2000.
- Soto, E. C., D. R. Yáñez-Ruiz, G. Cantalapiedra-Híjar, A. Vivas, A. I. Martín-García, and E. Molina Alcaide. Evolution of microbial communities in the rumen of goats and in single-flow continu-

- ous culture fermenters during adaptation to diet. Proc. Nutr. Soc. (Suppl.) In press.
- 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.
- Van Soest, P. J., C. J. Sniffen, and M. S. Allen. 1988. Rumen dynamics. Pages 21–42 in Aspects of Digestive Physiology in Ruminants. Proc. Satellite Symp. 30th Int. Congr. Int. Union Physiol. Sci. A. Dobson and M. J. Dobson, ed. Comstock Publishing Associates and Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal. Chem. 39:971–974.
- Yáñez-Ruiz, D. R., A. Moumen, and E. Molina-Alcaide. 2004. Comparative studies on microbial protein synthesis in the rumen of goats and sheep. J. Anim. Feed Sci. 13(Suppl. 1):251–254.



**PUBLICACIÓN 2**

**Experimento 2**

**(Publicado en Journal of Animal Science. 2009, 87:622-631)**

Efectos de la relación forraje:concentrado y del tipo de forraje sobre la digestibilidad aparente, fermentación ruminal y crecimiento microbiano en cabras

**Effects of forage:concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation and microbial growth in goats**





# Effects of forage:concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats<sup>1</sup>

G. Cantalapiedra-Hijar, D. R. Yáñez-Ruiz, A. I. Martín-García, and E. Molina-Alcaide<sup>2</sup>

Estación Experimental del Zaidín (Consejo Superior de Investigaciones Científicas),  
Profesor Albareda, 1. 18008 Granada, Spain

**ABSTRACT:** The effects of forage type and forage:concentrate ratio (F:C) on apparent nutrient digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth were investigated in goats. A comparison between liquid (LAB) and solid (SAB)-associated bacteria to estimate microbial N flow (MNF) from urinary purine derivative excretion was also examined. Treatments were a 2 × 2 factorial arrangement of forage type (grass hay vs. alfalfa hay) and high vs. low F:C (70:30 and 30:70, respectively). Four ruminally cannulated goats were fed, at maintenance intake, 4 experimental diets according to a 4 × 4 Latin square design. High-concentrate diets resulted in greater ( $P < 0.001$ ) nutrient digestibility except for ADF. However, CP digestibility increased ( $P < 0.001$ ) only for the high-concentrate diets including grass hay. Likewise, N retention, ruminal NH<sub>3</sub>-N concentration, and urinary excretion of purine derivatives increased ( $P < 0.05$ ) with increasing concentrate in animals fed diets based on grass hay (0.23 vs. 0.13 g of retained N/g of digested N, 30.1 vs. 12.9 mg of NH<sub>3</sub>-N/100 mL, and 11.5 vs. 8.40 mmol/d, respec-

tively), but not ( $P > 0.05$ ) when diets included alfalfa hay. Total protozoa numbers and holotricha proportion were greater and less ( $P < 0.001$ ), respectively, in high than in low-concentrate diets. The F:C affected ( $P < 0.001$ ) ruminal pH but not total VFA concentration ( $P = 0.12$ ). Ammonia-N concentration was similar ( $P = 0.13$ ) over time, whereas pH, VFA concentration, and protozoa numbers differed ( $P < 0.001$ ) among diets. Estimated MNF was strongly influenced by using either the purine bases:N ratio obtained in our experimental conditions or values reported in the literature for small ruminants. There was a F:C effect ( $P = 0.006$ ) on MNF estimated from LAB but not from SAB. The effect of F:C shifting from 70:30 to 30:70 in goat diets depends on the type of forage used. The MNF measured in goats fed different diets was influenced by the bacterial pellet (LAB or SAB). In addition, the purine bases:N ratio values found were different from those reported in the literature, which underlines the need for these variables to be analyzed directly in pellets isolated from specific animals and experimental conditions.

**Key words:** bacterial pellet, goat, microbial growth, purine derivative, rumen fermentation

©2009 American Society of Animal Science. All rights reserved.

J. Anim. Sci. 2009. 87:622–631  
doi:10.2527/jas.2008-1142

## INTRODUCTION

The demand for animal products is increasing in developing countries (Delgado et al., 1999), and, as a consequence, the demand for cereals for animal feed competes with that for human consumption. In addi-

tion, there is growing use of cereals in biofuel production, which has pushed the prices of most cereals to record levels (FAO, 2008). These facts highlight the need to design diverse strategies in animal nutrition to utilize alternative sources of nutrients and decrease cereal use.

The incorporation of concentrates into ruminant diets is intended to increase dietary energy, proteins, minerals, and vitamins and to optimize the efficiency of feed utilization (Morand-Fehr and Sauvant, 1987). However, grain supplementation may decrease digestibility of forage-containing diets for cattle and sheep (Archimède et al., 1995). The degree to which concentrates affect fiber digestion may depend on the nature and proportion of the concentrate as well as the quality of the forage (Matejovsky and Sanson, 1995).

The goat production systems traditionally developed in the Mediterranean Basin were based on graz-

<sup>1</sup>This research was supported by the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) of Spain (project AGL2004-04755-C02-02). G. Cantalapiedra-Hijar gratefully acknowledges support from Ministerio de Ciencia e Innovación for Formación de Profesorado Universitario (FPU) grant. Thanks to J. Fernández, V. Toledano, A. Moumen, and M.C. Sánchez (Estación Experimental del Zaidín, Granada, Spain) for technical assistance and to A. R. Mantecón (Instituto de Ganadería de Montaña, León, Spain) for providing us with diet ingredients.

<sup>2</sup>Corresponding author: molina@eez.csic.es

Received April 30, 2008.

Accepted October 20, 2008.

ing. However, there is a tendency toward intensification (Castel et al., 2003) and, hence, to the use of increasing amounts of concentrate in diets. The world goat population has been steadily increasing (39% increase from 1986 to 2000; FAO, 2008), but research into digestibility, ruminal fermentation, or microbial protein synthesis (Cerrillo et al., 1999; Yáñez-Ruiz et al., 2004) in goats fed different quality forages is scarce compared with that carried out with other animal species.

The objective of this study was to evaluate the effects of high vs. low concentrate levels using alfalfa (**A**) vs. grass (**G**) hay diets for goats on apparent nutrient digestibility, ruminal fermentation, and microbial protein synthesis. An additional aim was to compare the use of liquid (**LAB**) vs. solid (**SAB**)-associated rumen bacteria to estimate microbial N flow (**MNF**) from the rumen.

## MATERIALS AND METHODS

Animal management and experimental procedures were conducted by trained personnel in strict accordance with the Spanish research guidelines for animal protection.

### *Animals and Diets*

Four adult dry nonpregnant Granadina goats ( $46.3 \pm 3.0$  kg of BW) fitted with permanent ruminal cannulas were used in a  $4 \times 4$  Latin square design experiment, with a  $2 \times 2$  factorial arrangement of treatments. The main effects were forage type (G vs. A) and level (70 vs. 30%) of concentrate. Forages G and A differed mainly in CP and NDF content (95 and 192 g of CP/kg of DM, and 506 and 428 g of NDF/kg of DM, respectively). Ingredient composition of concentrate (g/kg of fresh matter) was as follows: 215 barley, 204 corn gluten meal, 200 wheat bran, 135 soybean, 115 palm meal, 50 wheat, 50 corn, 10 calcium carbonate, 10 white salt, 5 vitamin-mineral premix, 4 calcium soap, 4 dicalcium phosphate, and 3 sodium bicarbonate. Four complete diets were formulated and supplied to meet 1.2 times the energy maintenance requirements of the goats (Prieto et al., 1990). Treatments, on a DM basis, were: 70% G and 30% concentrate (**GF**), 30% G and 70% concentrate (**GC**), 70% A and 30% concentrate (**AF**), and 30% A and 70% concentrate (**AC**).

### *Apparent Nutrient Digestibility and Energy and N Utilization*

Animals were kept in individual metabolism crates where feces and urine were separately collected using a collector device equipped with a plastic net including an angled ramp. Animals had free access to water throughout the experiment. Concentrate and forage were manually mixed before feeding twice daily, at 0800 and 1400 h. A 5-L bucket containing 50 mL of 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  to keep the final pH below 3 was placed under

each crate for urine collection. Each of the 4 experimental periods consisted of 20 d: 10 d for diet adaptation, 7 d for digestibility determination, and 3 d in which microbial protein flow was estimated and rumen fermentation variables were analyzed. At the beginning of each trial, the animals were weighed to determine their food requirements, and feed samples were collected and kept at  $-20^\circ\text{C}$  for analysis. To calculate the apparent digestibility of diets, from d 11 through 17, total feces, urine, and refusals were daily weighed. Fecal, urine, and refusal samples were taken (20, 10, and 30% of the total wet weight, respectively) each sampling day, composited within animal and period, and stored at  $-20^\circ\text{C}$  before analysis.

### *Microbial N Flow*

From d 15 through 17, a 100-mL subsample of urine was collected daily and stored at  $-20^\circ\text{C}$  for purine derivative (**PD**) analysis, after measuring its density. On d 20, a 700-mL sample of rumen contents from each animal was collected 2 h after feeding for LAB and SAB isolation, following the procedure described by Martín-Orúe et al. (1998). The bacterial pellets obtained were freeze-dried before analysis.

### *Ruminal Fermentation*

On d 18, a 100-mL sample of rumen contents was individually collected at 0, 2, 4, 6, 8, 10, and 12 h after the morning feeding and squeezed through 4 layers of cheesecloth under continuous flushing with  $\text{CO}_2$ . The pH was measured immediately, and 3 different aliquots were taken at each time. Then, 5 mL of strained fluid was acidified with 5 mL of 0.5 M HCl and frozen for  $\text{NH}_3$  analysis. For VFA analysis, 800  $\mu\text{L}$  of a solution made up of orthophosphoric and crotonic acids (as internal standard) diluted in 0.5 M HCl was added to 800  $\mu\text{L}$  of strained rumen liquid and then frozen. A 5-mL aliquot was prepared for protozoa counting, following the procedure described by Dehority (1984). Twenty fields per aliquot were counted, and total protozoa numbers and holotricha proportion were recorded.

### *Chemical Analyses*

Once thawed, feed, refusals, and feces were dried in a forced-air oven at  $60^\circ\text{C}$  for 48 h and ground through a 1-mm sieve before being analyzed. The DM (method 934.01), ash (method 942.05), and N (method 984.13) contents were determined according to the AOAC (1999). The NDF and ADF contents were analyzed according to Van Soest et al. (1991) using an ANKOM Model 220 Fiber Analyzer (Macedon, NY). The  $\alpha$ -amylase was used for NDF analysis in concentrate and feces samples. Both NDF and ADF were expressed exclusive of residual ash. Samples of feed, refusals, feces, and urine were also analyzed for GE content in an adiabatic calorimeter (model 1356, Parr Instrument

**Table 1.** Chemical composition (g/kg of DM) and in vitro digestibility (g/g) of diet ingredients

| Item                      | Grass hay | Alfalfa hay | Concentrate |
|---------------------------|-----------|-------------|-------------|
| DM, g/kg of fresh matter  | 904       | 895         | 899         |
| OM                        | 933       | 893         | 905         |
| CP                        | 94.7      | 192         | 199         |
| Ether extract             | 16.1      | 14.9        | 33.1        |
| NDF                       | 506       | 428         | 329         |
| ADF                       | 273       | 320         | 131         |
| ADL                       | 39.2      | 73.0        | 27.0        |
| GE, MJ/kg of DM           | 18.7      | 18.3        | 18.2        |
| IVDMD                     | 0.60      | 0.66        | 0.78        |
| In vitro OM digestibility | 0.60      | 0.65        | 0.78        |
| In vitro CP digestibility | 0.68      | 0.79        | 0.82        |

Co., Moline, IL). In vitro DM and OM digestibilities of diet ingredients were determined according to the procedure described by Tilley and Terry (1963), using an ANKOM Model Daisy Incubator.

Urinary PD, including allantoin, hypoxanthine, uric acid, and xanthine, as well as creatinine and bacterial pellets purine base (PB) content, were determined following the procedures described by Balcells et al. (1992), using HPLC analysis. Aliquots of strained rumen content collected at different times after feeding were thawed in the refrigerator overnight, centrifuged at 4°C and 20,000 × *g* for 20 min, and the supernatant was analyzed for VFA and NH<sub>3</sub>-N. Individual VFA were analyzed (Isac et al., 1994) by gas chromatography. The NH<sub>3</sub>-N concentration was determined by a colorimetric method (Weatherburn, 1967).

### Calculations and Statistical Analysis

Apparent digestibility was calculated as 1 minus the quotient between fecal output and diet intake. Microbial N flow was calculated as described by Belenguer et al. (2002) for goats: MNF (g/d) = (PD excretion/0.76)/(0.92 × PB:N), where 0.76 is the incremental recovery of PD, 0.92 is the true digestibility of duodenal PB (Chen et al., 1990), and PB:N is the ratio between PB and N content recorded in LAB, SAB, or an average value from both bacterial pellets.

Data were analyzed as a 4 × 4 Latin square with a 2 × 2 factorial arrangement of treatments, using the GLM procedure (SPSS v.15, SPSS Inc., Chicago, IL). The linear model used for each dependent variable accounted for the effects of forage type (F), F:concentrate ratio (F:C), F × F:C interaction, and period as fixed effects. Animal was considered a random effect. Effects were considered significant at *P* < 0.05. When significant differences were detected, differences among means were tested using Tukey's comparison test. Data corresponding to ruminal content samples, obtained at different times after feeding, were analyzed taking into account the correlation among repeated measures from the same animal, and accordingly, a linear mixed model procedure (Littell et al., 1998) was used rath-

er than GLM. The linear mixed model contained the same fixed effects described for GLM model, except that time after feeding and its interaction with main factors were included (Rotger et al., 2006). Time after feeding was considered as the repeated factor and each animal within treatment as the subject. For each variable analyzed, data were subjected to 3 different covariance structures: variance components, compound symmetry, and unstructured. The covariance structure that yielded the greatest Schwarz's Bayesian was considered to be the most desirable for analysis (Littell et al., 1998).

## RESULTS AND DISCUSSION

In this work, we studied the effect of increasing the level of concentrate in diets based on 2 forages (G vs. A) of different quality that are commonly used in Mediterranean goat farming. The significance of the F × F:C interaction is used to evaluate the differential response of both forages to shifts in F:C from 70:30 to 30:70.

### Composition, Apparent Nutrient Digestibility, and Energy and N Utilization

Composition and in vitro digestibility of diet ingredients are shown in Table 1. Grass hay was less in CP and greater in NDF than A and concentrate. In vitro CP digestibility values for concentrate, A, and G were 0.82, 0.79, and 0.68, respectively. Differences between both forages in composition and nutrient availability can explain the different effect of increasing concentrate level (F × F:C interaction) on digestibility variables.

Although offered DM was the same for all diets, nutrient intakes (Table 2), except for OM and NDF, were greater (*P* ≤ 0.04) for diets based on A than G, which may be due to a greater palatability of A and differences in chemical composition and in vitro digestibility between both forages. Moreover, intake of legume forages seems to be greater than G due to less cell wall content, greater ruminal degradation, and faster digestion and passage rates (Pinos-Rodríguez et al., 2002) in legumes than in grass. The NDF and ADF intake were greater (*P* ≤ 0.004) for low- than high-concentrate diets, owing to the greater cell wall content of forages compared with concentrate, as has been reported previously for goats (Ramanzin et al., 1997; Kawas et al., 1999). The effect of increasing the level of concentrate on CP and NDF intake depended on the forage fed (F × F:C interaction; *P* ≤ 0.05). The greater similarity in CP and NDF content between forage A and concentrate compared with forage G can explain these results. Increasing concentrate proportions in diets based on A did not result in greater N supply, whereas it increased it in diets based on G by almost 50%.

Increasing concentrate in diets increased (*P* < 0.001) apparent nutrient digestibilities except for ADF (*P* = 0.13). In general, it is accepted that adding concentrate to ruminant diets increases DM and OM digestibility

**Table 2.** Effect of forage (F) and forage:concentrate ratio (F:C) on intake and in vivo apparent digestibility of diets by goats

| Item                                | Diet <sup>1</sup>  |                   |                    |                    | SEM    | P-value |        |         |
|-------------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------|---------|--------|---------|
|                                     | GF                 | GC                | AF                 | AC                 |        | F       | F:C    | F × F:C |
| Intake, g/kg of BW <sup>0.75</sup>  |                    |                   |                    |                    |        |         |        |         |
| DM                                  | 46.4               | 45.8              | 49.3               | 51.3               | 0.80   | 0.04    | 0.67   | 0.45    |
| OM                                  | 42.9               | 42.4              | 44.1               | 45.5               | 1.1    | 0.08    | 0.19   | 0.87    |
| CP                                  | 5.65 <sup>a</sup>  | 7.30 <sup>b</sup> | 9.48 <sup>c</sup>  | 9.85 <sup>c</sup>  | 0.12   | <0.001  | 0.006  | 0.04    |
| NDF                                 | 22.0 <sup>b</sup>  | 16.6 <sup>a</sup> | 20.0 <sup>ab</sup> | 18.4 <sup>ab</sup> | 0.4    | 0.89    | 0.004  | 0.05    |
| ADF                                 | 10.3 <sup>ab</sup> | 7.61 <sup>a</sup> | 13.0 <sup>b</sup>  | 9.50 <sup>ab</sup> | 0.16   | <0.001  | <0.001 | 0.23    |
| In vivo apparent digestibility, g/g |                    |                   |                    |                    |        |         |        |         |
| DM                                  | 0.67 <sup>a</sup>  | 0.78 <sup>b</sup> | 0.67 <sup>a</sup>  | 0.74 <sup>b</sup>  | 0.0058 | 0.11    | <0.001 | 0.10    |
| OM                                  | 0.68 <sup>a</sup>  | 0.81 <sup>b</sup> | 0.69 <sup>a</sup>  | 0.77 <sup>b</sup>  | 0.0053 | 0.09    | <0.001 | 0.07    |
| CP                                  | 0.63 <sup>a</sup>  | 0.82 <sup>b</sup> | 0.80 <sup>b</sup>  | 0.79 <sup>b</sup>  | 0.0052 | <0.001  | <0.001 | <0.001  |
| NDF                                 | 0.64 <sup>b</sup>  | 0.72 <sup>c</sup> | 0.55 <sup>a</sup>  | 0.67 <sup>b</sup>  | 0.0039 | <0.001  | <0.001 | 0.07    |
| ADF                                 | 0.58 <sup>a</sup>  | 0.71 <sup>b</sup> | 0.56 <sup>a</sup>  | 0.54 <sup>a</sup>  | 0.015  | 0.02    | 0.13   | 0.04    |
| GE                                  | 0.66 <sup>a</sup>  | 0.76 <sup>b</sup> | 0.68 <sup>a</sup>  | 0.74 <sup>b</sup>  | 0.025  | 0.91    | <0.001 | 0.04    |

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

<sup>1</sup>GF = 70% grass hay and 30% concentrate, DM basis; GC = 30% grass hay and 70% concentrate, DM basis; AF = 70% alfalfa hay and 30% concentrate, DM basis; AC = 30% alfalfa hay and 70% concentrate, DM basis.

(Molina-Alcaide et al., 2000; Fimbres et al., 2002). However, there is some controversy regarding the digestibility of other nutrients when forage is supplemented with concentrate in the diet of the goat, which is likely to be due to the type of ingredients used in each experiment and also to the pH in the rumen. Molina-Alcaide et al. (2000) reported increased digestibility of all nutrients except for CP in Granadina goats when diets based on A were supplemented with sugar beet pulp and oat grain. Likewise, Cerrillo et al. (1999) supplemented a diet based on hay for goats with grain, in proportions varying from 0 to 50%, and found increased DM digestibility, but no effect on CP digestibility. Ramanzin et al. (1997) observed increased OM and N apparent digestibility with decreasing F:C in goats, whereas the digestibility of fibrous fraction decreased. Similarly, decreased ruminal fiber digestion has been observed in goats fed A when concentrate was incorporated at a 1:1 ratio (Antoniou and Hadjipanayiotou, 1985). The decrease in ruminal fiber digestion is believed to be caused by the inhibited growth of cellulolytic bacteria when ruminal pH decreases below 6.2 (Grant and Mertens, 1992). In this experiment, the addition of high levels of concentrate did not decrease either NDF or ADF apparent digestibility ( $P > 0.05$ ), perhaps because ruminal pH was not low enough to negatively affect fiber digestion. Increased CP digestibility with high level of concentrate was observed only in diets including G (F × F:C interaction;  $P < 0.001$ ). Because A had greater in vitro CP digestibility than G and was more similar to that of concentrate, the effect of increasing concentrate proportions had only a significant effect on diets based on G. On the other hand, diets based on G had greater ADF digestibility ( $P = 0.02$ ) compared with those based on A, because rumen retention time is shorter with legumes than G (Pinos-Rodríguez et al., 2002). In our study, this is confirmed in diets based on G, but only when high level of concentrate was added (F ×

F:C interaction;  $P = 0.04$ ), likely because the greater microbial growth and fiber digestion promoted by high level of concentrate allowed the differences in ADF digestibility between the forages to be observed more clearly. The GE digestibility increased with high levels of concentrate ( $P < 0.001$ ) for both forages studied, but the different magnitude of increase led to a significant F × F:C interaction effect ( $P = 0.04$ ). This supports once more that the effect of changing F:C from 70:30 to 30:70 on nutrient digestibility was more beneficial for diets based on G than those based on A.

Energy losses in feces (Table 3) were less for high- than low-concentrate diets ( $P < 0.01$ ), as reported by Molina-Alcaide et al. (2000) in goats. More N (g/g of N intake) was retained in goats fed diets based on G when the concentrate level increased ( $P > 0.05$ ), whereas N retention remained the same in diets based on A regardless of concentrate proportion (F × F:C interaction;  $P = 0.05$ ). As mentioned above, similar in vitro N digestibility and N content in A and concentrate may explain the different response observed between diets based on A and G when concentrate level increased. High level of concentrate in diets based on A did not result in a more efficient use of N. Because A is one of the most common preserved forages used for goat feeding, care must be taken by goat producers and nutritionists when supplementing diets based on A to avoid N waste and save money.

### Ruminal Fermentation

Average pH values were unaffected ( $P = 0.63$ ) by F (Table 4), but a F:C effect was evident ( $P < 0.001$ ) as reported in previous studies with goats (Hadjipanayiotou and Antoniou, 1983; Cerrillo et al., 1999). Greater amounts of starch in high-concentrate diets may yield greater lactic acid concentration (Slyter, 1976), and hence less ruminal pH, compared with low-concentrate



**Table 3.** Effect of forage (F) and forage:concentrate ratio (F:C) on energy and N metabolism in goats fed the experimental diets

| Item   | Diet <sup>1</sup> |                    |                   |                    | SEM    | P-value |        |         |
|--|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------|---------|--------|---------|
|  | GF                | GC                 | AF                | AC                 |        | F       | F:C    | F × F:C |
| Energy metabolism                            |                   |                    |                   |                    |        |         |        |         |
| Intake, kJ/kg of BW <sup>0.75</sup>          | 861               | 839                | 907               | 936                | 13     | 0.03    | 0.91   | 0.36    |
| Energy in feces, kJ/kg of BW <sup>0.75</sup> | 297 <sup>b</sup>  | 202 <sup>a</sup>   | 293 <sup>b</sup>  | 246 <sup>ab</sup>  | 6.0    | 0.15    | <0.001 | 0.10    |
| Energy in urine, kJ/kg of BW <sup>0.75</sup> | 36.7              | 38.4               | 46.8              | 45.0               | 1.6    | 0.04    | 0.98   | 0.60    |
| N metabolism                                 |                   |                    |                   |                    |        |         |        |         |
| N intake, g/kg of BW <sup>0.75</sup>         | 0.90 <sup>a</sup> | 1.17 <sup>b</sup>  | 1.52 <sup>c</sup> | 1.58 <sup>c</sup>  | 0.052  | <0.001  | 0.006  | 0.04    |
| N in feces, g/kg of BW <sup>0.75</sup>       | 0.33 <sup>b</sup> | 0.21 <sup>a</sup>  | 0.30 <sup>b</sup> | 0.33 <sup>b</sup>  | 0.0092 | <0.001  | 0.56   | 0.09    |
| N in urine, g/kg of BW <sup>0.75</sup>       | 0.50 <sup>a</sup> | 0.74 <sup>b</sup>  | 0.92 <sup>c</sup> | 0.98 <sup>c</sup>  | 0.021  | <0.001  | 0.008  | 0.05    |
| Retained N                                   |                   |                    |                   |                    |        |         |        |         |
| g/kg of DMI                                  | 1.52 <sup>a</sup> | 4.77 <sup>ab</sup> | 6.08 <sup>b</sup> | 5.25 <sup>ab</sup> | 0.24   | 0.03    | 0.22   | 0.06    |
| g/g of N intake                              | 0.09 <sup>a</sup> | 0.19 <sup>b</sup>  | 0.20 <sup>b</sup> | 0.17 <sup>b</sup>  | 0.0082 | 0.16    | 0.15   | 0.05    |
| g/g of digested N                            | 0.13 <sup>a</sup> | 0.23 <sup>b</sup>  | 0.25 <sup>b</sup> | 0.22 <sup>b</sup>  | 0.017  | 0.18    | 0.29   | 0.01    |

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

<sup>1</sup>GF = 70% grass hay and 30% concentrate, DM basis; GC = 30% grass hay and 70% concentrate, DM basis; AF = 70% alfalfa hay and 30% concentrate, DM basis; AC = 30% alfalfa hay and 70% concentrate, DM basis.

diets. The pH response over time was different ( $P < 0.001$ ) among diets with greater decreases in pH after feeding (Figure 1A) in goats receiving diets containing A than in those including G. This might be explained by the slightly greater degradability and the greater DMI ( $P = 0.04$ ) of diets based on A. These factors may also contribute to the greater ( $P = 0.001$ ) total VFA concentration in the rumen of goats fed diets including A in comparison with those receiving diets based on G.

Total VFA concentration in the rumen of goats fed diets based on A was within the range previously reported for Granadina and Saanen goats fed similar diets (Molina-Alcaide et al., 2000; Fujita et al., 2006). The expected increase in VFA concentration with high level of concentrate, and hence more digestible OM, was not observed ( $P = 0.12$ ). High fiber content in the concentrate (329 g of NDF/kg of DM) may promote

similar VFA regardless of the concentrate proportion in the diet. Likewise, Archimède et al. (1996) and Cerrillo et al. (1999) found no effect of concentrate content on total VFA concentration in the rumen of goats. Because of greater fluctuations over time for diets based on A (Figure 1B) in comparison with G, a time after feeding × diet interaction ( $P < 0.001$ ) was detected for postprandial changes in VFA concentration. The molar proportion of acetate decreased with concentrate level, whereas the proportions of propionate and butyrate increased ( $P < 0.001$ ), as reported by others in goats (Archimède et al. 1996). Diets based on A promoted greater molar proportions of propionate and valerate ( $P \leq 0.04$ ) and less ( $P = 0.02$ ) proportions for butyrate compared with diets based on G.

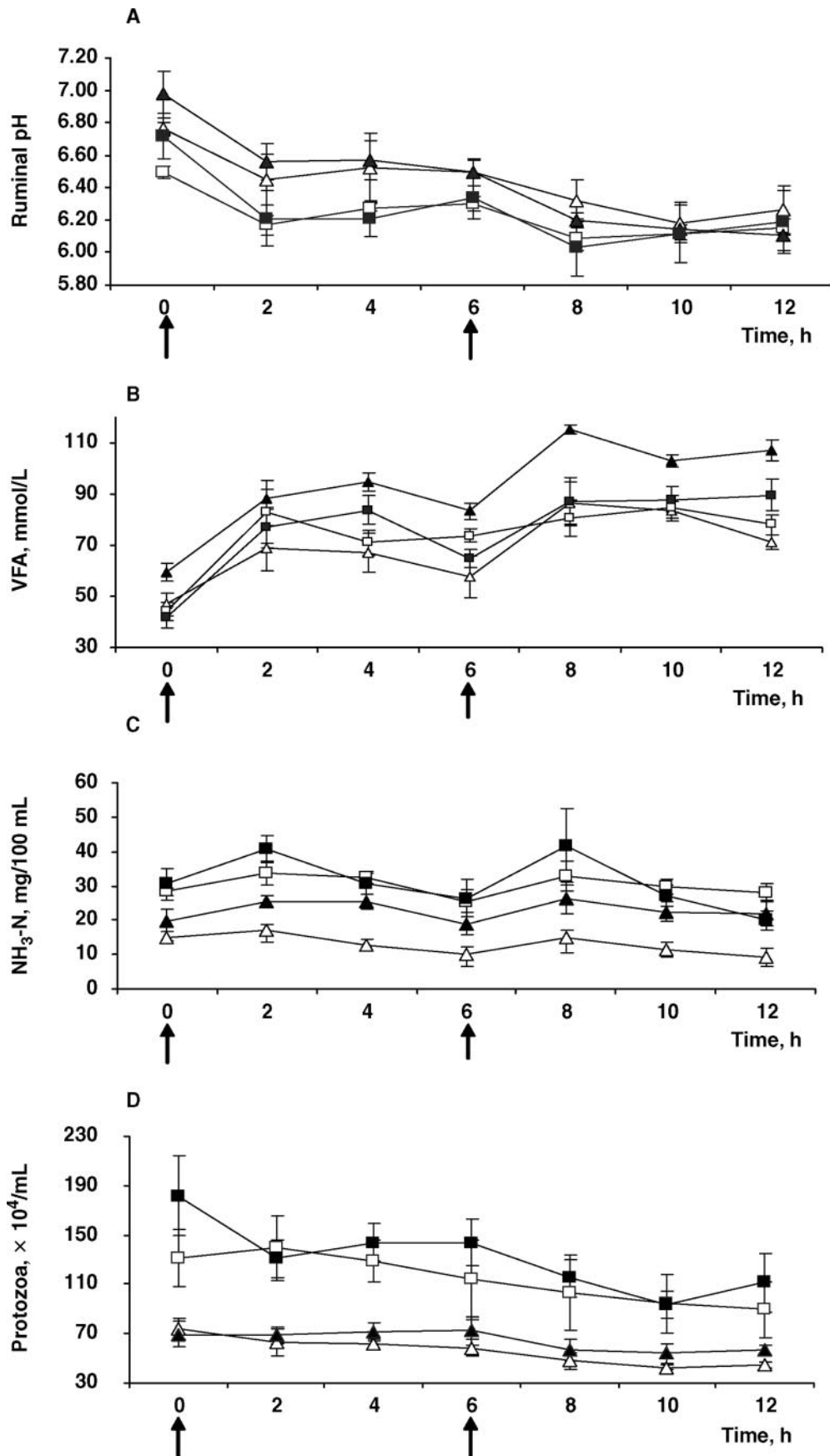
The ruminal NH<sub>3</sub>-N concentration varied ( $P < 0.001$ ), being greater for high- than low-concentrate diets, and for diets based on A compared with those based on G

**Table 4.** Effect of forage (F) and forage:concentrate ratio (F:C) on ruminal fermentation, total protozoa concentration, and holotricha proportion in goats consuming the experimental diets

| Item                                 | Diet <sup>1</sup> |                    |                    |                    | SEM   | P-value |        |         |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|---------|--------|---------|
|                                      | GF                | GC                 | AF                 | AC                 |       | F       | F:C    | F × F:C |
| pH                                   | 6.43              | 6.21               | 6.43               | 6.26               | 0.055 | 0.63    | <0.001 | 0.71    |
| NH <sub>3</sub> -N, mg/100 mL        | 12.9 <sup>a</sup> | 30.1 <sup>b</sup>  | 22.9 <sup>b</sup>  | 31.0 <sup>b</sup>  | 1.9   | <0.001  | <0.001 | 0.002   |
| Total VFA, mmol/L                    | 68.8 <sup>a</sup> | 74.7 <sup>a</sup>  | 93.0 <sup>b</sup>  | 75.9 <sup>ab</sup> | 4.2   | <0.001  | 0.12   | 0.002   |
| VFA, mol/100 mol                     |                   |                    |                    |                    |       |         |        |         |
| Acetate                              | 70.2 <sup>b</sup> | 65.4 <sup>a</sup>  | 68.3 <sup>ab</sup> | 66.2 <sup>a</sup>  | 0.64  | 0.17    | <0.001 | 0.05    |
| Propionate                           | 16.0 <sup>a</sup> | 18.4 <sup>b</sup>  | 17.4 <sup>ab</sup> | 19.3 <sup>b</sup>  | 0.52  | 0.04    | <0.001 | 0.60    |
| Butyrate                             | 10.8 <sup>a</sup> | 12.9 <sup>b</sup>  | 10.4 <sup>a</sup>  | 11.1 <sup>ab</sup> | 0.41  | 0.02    | <0.001 | 0.08    |
| Isobutyrate                          | 0.79              | 0.86               | 1.0                | 0.88               | 0.078 | 0.10    | 0.66   | 0.35    |
| Valerate                             | 1.02 <sup>a</sup> | 1.29 <sup>a</sup>  | 1.91 <sup>b</sup>  | 1.76 <sup>b</sup>  | 0.086 | <0.001  | 0.24   | 0.03    |
| Isovalerate                          | 1.07              | 1.02               | 1.05               | 0.97               | 0.12  | 0.81    | 0.72   | 0.96    |
| Acetate: propionate                  | 4.45 <sup>b</sup> | 3.50 <sup>a</sup>  | 3.95 <sup>ab</sup> | 3.47 <sup>a</sup>  | 0.11  | 0.04    | <0.001 | 0.15    |
| Total protozoa, ×10 <sup>4</sup> /mL | 58.3 <sup>a</sup> | 128.3 <sup>b</sup> | 67.5 <sup>a</sup>  | 133.1 <sup>b</sup> | 5.8   | 0.04    | <0.001 | 0.47    |
| Holotricha, %                        | 6.40 <sup>b</sup> | 1.35 <sup>a</sup>  | 6.53 <sup>b</sup>  | 2.58 <sup>a</sup>  | 0.42  | 0.28    | <0.001 | 0.38    |

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

<sup>1</sup>GF = 70% grass hay and 30% concentrate, DM basis; GC = 30% grass hay and 70% concentrate, DM basis; AF = 70% alfalfa hay and 30% concentrate, DM basis; AC = 30% alfalfa hay and 70% concentrate, DM basis.



**Figure 1.** Ruminal pH (A), total VFA concentration (B), NH<sub>3</sub>-N concentration (C), and total protozoa concentration (D) with time after feeding in the rumen of goats fed the experimental diets. Diets were 70% grass hay and 30% concentrate (GF = △), 30% grass hay and 70% concentrate (GC = □), 70% alfalfa hay and 30% concentrate (AF = ▲), and 30% alfalfa hay and 70% concentrate (AC = ■). Diet × time after feeding interaction values were significant ( $P < 0.001$ ) for ruminal pH, VFA, and total protozoa concentration, but not ( $P = 0.13$ ) for NH<sub>3</sub>-N concentration. Arrows show feeding times.

( $P < 0.001$ ). Because CP content and in vitro CP digestibility (both factors involved in ruminal  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentration) were similar in A and concentrate, the shift in the level of concentrate did not increase ruminal  $\text{NH}_3$  concentration in animals fed diets based on A ( $F \times F:C$  interaction;  $P = 0.002$ ). Factors promoting greater  $\text{NH}_3$  yield, such as the presence of A and a high proportion of concentrate in the diet, also seemed to be responsible for greater ( $P \leq 0.03$ ) urinary PD excretion. A relationship between rumen  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentration above the minimum required to maximize microbial protein synthesis (3.3 to 8.5 mg/100 mL; Kang-Meznarich and Broderick, 1981) and urinary PD excretion was also found by Balcells et al. (1993). Ruminal  $\text{NH}_3\text{-N}$  values were within the range of those found in previous studies with goats fed similar diets (Molina-Alcaide et al., 2000; Fujita et al., 2006) and less than those reported by Isac et al. (1994) and Yáñez-Ruiz et al. (2004). Concentration of  $\text{NH}_3$  over time (Figure 1C) was similar among diets (time after feeding  $\times F \times F:C$  interaction;  $P = 0.13$ ), peaking about 2 h after feeding.

Total protozoa numbers were affected by  $F:C$  ( $P < 0.001$ ) and  $F$  ( $P < 0.04$ ), and they also were different ( $P < 0.001$ ) among diets across time (Figure 1D). Despite differences observed among ruminants for protozoa numbers (Santra et al., 1998; Yáñez-Ruiz et al., 2004) and the role of protozoa in fiber degradation and N turnover in the rumen (Eugene et al., 2004), information about diurnal variation of rumen protozoa numbers in goats fed different diets is very scarce in the literature. The progressive decrease of ciliate protozoa in the rumen after feeding has been widely described and ascribed to sequestration of Entodiniomorpha and also to the dilution effect of saliva influx and passage rate (Dehority, 2003). Total protozoa numbers were similar to values obtained by Yáñez-Ruiz et al. (2004) in Granadina goats fed A or A plus concentrate. Greater protozoa numbers were found with mixed diets than with those based on forage alone (Grubb and Dehority, 1975). Dennis et al. (1983) reported greater protozoa numbers in cattle as the proportion of concentrate in the diet increased from 30 to 70%, as found in the present study. Greater rapidly fermentable carbohydrates in diets including high levels of concentrate may explain the increase of protozoa numbers (Franzolin and Dehority, 1996). The proportion of holotricha was less ( $P < 0.01$ ) for high- than low-concentrate diets, likely because the increase in the amount of starch (Dennis et al. 1983) and the lesser pH (Williams and Coleman, 1991) with high-concentrate diets may promote greater numbers of entodinia compared with holotricha.

### Microbial N Flow

Creatinine excretion (Table 5) varied from 410 to 467  $\mu\text{mol/kg}$  of  $\text{BW}^{0.75}$ , which was within the range of values reported for goats and sheep fed at maintenance level (Chen et al., 1992; Yáñez-Ruiz et al., 2004) and greater than those obtained by Mota et al. (2008) with

similar diets fed to lactating goats (382  $\mu\text{mol/kg}$  of  $\text{BW}^{0.75}$ ). Because BW of the experimental animals did not change over time and urinary excretion of creatinine is considered as an index of lean body mass (Van Niekerk et al., 1963), the similar levels of creatinine excretion among animals and across periods in the present experiment ensures that total urine production was indeed collected.

Total urinary excretion of PD in animals fed diets based on A was similar to that obtained by Belenguer et al. (2002) in Granadina goats fed A at maintenance level (701  $\mu\text{mol}$  of PD/kg of  $\text{BW}^{0.75}$ ). However, our values were less (792 vs. 982  $\mu\text{mol/kg}$  of  $\text{BW}^{0.75}$ ) than those obtained by Mota et al. (2008) in lactating Granadina goats fed A and concentrate (75:25), which may be due to greater OM and N intakes in lactating than in dry goats; the contribution of milk PD to total excretion in lactating goats is very low (from 0.3 to 1%). Values obtained in animals fed diets based on G are slightly less than those found by Chen et al. (1992) and by Santoso et al. (2007) in goats fed a 70:30 diet based on G and concentrate (700  $\mu\text{mol/kg}$  of  $\text{BW}^{0.75}$ ) and in sheep fed a diet based on timothy hay supplemented with rolled barley (649  $\mu\text{mol/kg}$  of  $\text{BW}^{0.75}$ ), respectively. However, the intake was slightly greater in both studies than that of animals consuming diets based on G in the present experiment (66.0 and 56.6 g of DM/kg of  $\text{BW}^{0.75}$ , respectively, vs. 46.1 g of DM/kg of  $\text{BW}^{0.75}$ ).

Urinary PD excretion (mmol/d) was greater ( $P < 0.001$ ) in animals fed diets based on A than in those receiving diets including G. On the other hand, urinary PD excretion was greater ( $P = 0.03$ ) with high- than low-concentrate diets. However, despite the fact that high-concentrate diets led to greater ( $P = 0.002$ ) digestible OM intake (DOMI), the relationship between urinary PD excretion and DOMI previously reported (Chen et al., 1992; Pérez et al., 1998) was only significant ( $P < 0.05$ ) in goats fed diets based on G ( $F \times F:C$  interaction;  $P = 0.08$ ). Ruminal microbial protein synthesis depends mainly on an adequate supply of carbohydrates as the energy source, which is believed to be the main factor limiting microbial growth. The supply of available N and the synchrony with which N and energy become available are also factors influencing microbial protein synthesis in the rumen (Bach et al., 2005). In this experiment, high levels of concentrate enhanced DOMI ( $P = 0.002$ ) with both forages, whereas N intake only increased in goats receiving diets based on G ( $F \times F:C$  interaction;  $P = 0.01$ ). The PD excretion seemed to depend not only on DOMI but also on N intake, which should be also taken into account when interpreting urinary PD excretion results.

In general, estimation of microbial N supply from urinary PD excretion assumes a constant PB:N ratio in ruminal microbial pellets (Chen et al., 1992). However, this ratio may change with diet (Ranilla and Carro, 2003), time after feeding (Cecava et al., 1990), type of bacterial pellet (Firkins et al., 1987), or incomplete degradation of dietary purines in the rumen (Smith et



**Table 5.** Effect of forage source (F) and forage:concentrate ratio (F:C) on daily urinary purine derivatives excretion and microbial N flow in goats consuming the experimental diets

| Item   | Diet <sup>1</sup> |                    |                   |                   | SEM   | <i>P</i> -value |        |         |
|--|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------|-----------------|--------|---------|
|  | GF                | GC                 | AF                | AC                |       | F               | F:C    | F × F:C |
| Digestible OM intake, g/kg of BW <sup>0.75</sup>           | 29.7 <sup>a</sup> | 35.4 <sup>b</sup>  | 30.4 <sup>a</sup> | 35.2 <sup>b</sup> | 0.49  | 0.84            | 0.002  | 0.69    |
| Digested N intake, g/kg of BW <sup>0.75</sup>              | 0.59 <sup>a</sup> | 0.98 <sup>b</sup>  | 1.22 <sup>c</sup> | 1.31 <sup>c</sup> | 0.019 | <0.001          | <0.001 | 0.01    |
| Purine derivatives in urine, μmol/kg of BW <sup>0.75</sup> |                   |                    |                   |                   |       |                 |        |         |
| Allantoin  | 422 <sup>a</sup>  | 593 <sup>b</sup>   | 692 <sup>c</sup>  | 718 <sup>c</sup>  | 19    | 0.005           | 0.10   | 0.23    |
| Xanthine   | 4.49              | 7.00               | 14.6              | 13.5              | 1.7   | 0.05            | 0.83   | 0.61    |
| Hypoxanthine   | 15.3              | 21.6               | 39.7              | 37.8              | 5.5   | 0.12            | 0.84   | 0.72    |
| Uric acid  | 20.0              | 26.2               | 38.5              | 28.8              | 2.3   | 0.03            | 0.34   | 0.32    |
| Total purine derivative excretion                          |                   |                    |                   |                   |       |                 |        |         |
| mmol/d   | 8.40 <sup>a</sup> | 11.5 <sup>b</sup>  | 13.8 <sup>b</sup> | 14.3 <sup>b</sup> | 0.33  | <0.001          | 0.03   | 0.08    |
| μmol/kg of BW <sup>0.75</sup>                              | 462 <sup>a</sup>  | 648 <sup>b</sup>   | 785 <sup>b</sup>  | 798 <sup>b</sup>  | 19    | <0.001          | 0.04   | 0.08    |
| mmol/kg of RDOM <sup>2</sup>                               | 24 <sup>a</sup>   | 28 <sup>ab</sup>   | 40 <sup>c</sup>   | 34 <sup>bc</sup>  | 0.89  | <0.001          | 0.73   | 0.04    |
| μmol/g of digested N                                       | 795 <sup>b</sup>  | 668 <sup>ab</sup>  | 641 <sup>ab</sup> | 612 <sup>a</sup>  | 13    | 0.006           | 0.02   | 0.10    |
| Creatinine excretion, μmol/kg of BW <sup>0.75</sup>        | 410               | 467                | 462               | 415               | 14    | 0.99            | 0.90   | 0.23    |
| Purine bases:N ratio, μmol/mg                              |                   |                    |                   |                   |       |                 |        |         |
| Liquid-associated bacteria (LAB)                           | 0.98              | 1.12               | 1.10              | 0.89              | 0.062 | 0.67            | 0.69   | 0.20    |
| Solid-associated bacteria (SAB)                            | 0.72              | 1.14               | 1.16              | 0.71              | 0.083 | 0.76            | 0.99   | 0.53    |
| Average value LAB + SAB                                    | 0.85              | 1.13               | 1.13              | 0.80              | 0.061 | 0.95            | 0.91   | 0.36    |
| Microbial N flow, <sup>3</sup> g/d                         |                   |                    |                   |                   |       |                 |        |         |
| LAB  | 12.1 <sup>a</sup> | 14.7 <sup>ab</sup> | 18.1 <sup>b</sup> | 23.1 <sup>c</sup> | 0.45  | <0.001          | 0.006  | 0.23    |
| SAB  | 16.3 <sup>a</sup> | 14.4 <sup>a</sup>  | 17.0 <sup>a</sup> | 28.9 <sup>b</sup> | 0.63  | <0.001          | 0.002  | <0.001  |
| Average value LAB + SAB                                    | 13.9 <sup>a</sup> | 14.5 <sup>a</sup>  | 17.5 <sup>a</sup> | 25.6 <sup>b</sup> | 0.60  | <0.001          | 0.003  | 0.009   |
| Microbial synthesis efficiency, g/kg of RDOM               |                   |                    |                   |                   |       |                 |        |         |
| LAB  | 35 <sup>a</sup>   | 36 <sup>a</sup>    | 51 <sup>b</sup>   | 56 <sup>b</sup>   | 1.2   | <0.001          | 0.29   | 0.49    |
| SAB  | 47 <sup>a</sup>   | 36 <sup>a</sup>    | 49 <sup>a</sup>   | 69 <sup>b</sup>   | 1.6   | <0.001          | 0.13   | <0.001  |
| Average value LAB + SAB                                    | 40 <sup>ab</sup>  | 36 <sup>a</sup>    | 50 <sup>bc</sup>  | 59 <sup>c</sup>   | 1.5   | <0.001          | 0.19   | 0.01    |

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

<sup>1</sup>GF = 70% grass hay and 30% concentrate, DM basis; GC = 30% grass hay and 70% concentrate, DM basis; AF = 70% alfalfa hay and 30% concentrate, DM basis; AC = 30% alfalfa hay and 70% concentrate, DM basis.

<sup>2</sup>RDOM = rumen-degradable OM, calculated as  $0.65 \times$  digestible OM intake.

<sup>3</sup>Calculated as reported by Belenguer et al. (2002): Microbial N flow = (PD excretion/0.76)/(0.92 × PB:N ratio), where 0.76 is the incremental recovery of purine derivatives (PD), 0.92 is the true digestibility of duodenal purine bases (PB; Chen et al., 1990), and PB:N is the ratio between PB and N content recorded in LAB, SAB, or an average value from both bacterial pellets.

al., 1978). The isolation of bacterial pellets from the rumen liquid phase is unlikely to be representative of the whole microbial biomass reaching the duodenum, because it lacks both protozoa cells and, what is more important, SAB, which may account for up to 75% of the total microbial mass (Craig et al., 1987). Despite that protozoa are largely retained within the rumen, its contribution to the duodenal N flow may be as high as 40% of the total MNF (Yáñez-Ruiz et al., 2006). Thus, it seems necessary to take into account the composition of both protozoa and SAB when estimating the contribution of microbial N to the duodenal flow.

In the present study, despite the fact that similar PB:N ratio values were found in LAB vs. SAB across the diets ( $P = 0.17$ ; data not shown), estimations of MNF to the duodenum ( $P = 0.02$ ; data not shown) and the microbial N synthesis efficiency ( $P = 0.01$ ; data not shown) depended on the bacterial pellet used, suggesting that much of the variation reported in the literature is associated with the bacterial pellet of choice and the method used to isolate it. The PB:N values found in LAB were less than those obtained by Belenguer et al. (2002) in goats fed A at maintenance level (1.92 μmol/mg) and by Chen et al. (1992) in sheep (1.66 μmol/mg).

However, our results agree with the assumption made by Chen et al. (1992) concerning the lack of diet effect on the PB:N ratio of mixed ruminal microbes, because there were no differences in the PB:N ratio in LAB, SAB, or an average value from SAB and LAB among treatments ( $P > 0.05$ ). The use of LAB or SAB pellets to estimate MNF produced contradictory results; when LAB was used, MNF was greater ( $P = 0.006$ ) for high- than for low-concentrate diets, whatever the forage used. When SAB or an average value from SAB and LAB were considered, differences ( $P < 0.01$ ) were found between diets based on G and A. Microbial yield efficiency ranged from 35.2 to 69.2 g of N/kg of rumen-degradable OM (RDOM), depending on the bacterial pellet used for MNF estimation. With LAB, efficiency was greater ( $P < 0.001$ ) for diets based on A than for those based on G, which might be due to less N intakes for the latter. High concentrate in diet did not modify ( $P > 0.05$ ) microbial synthesis efficiency, likely because greater protozoa numbers ( $P < 0.001$ ) result in more bacterial predation (Harrison et al., 1979). Most of the values obtained were above the mean value (32 g/kg of RDOM) established by the ARC (1984) for sheep fed different diets and much greater than values reported

by others (Chen et al., 1992; Pérez et al., 1996; Fujihara et al., 2005) despite similar levels of PD excretion, which may be due to the decreased PB:N ratio found in this experiment in comparison with others. Obispo and Dehority (1999) suggested that mixed ruminal bacteria may be contaminated with feed particles containing protein, which would result in an overestimation of MNF due to a decreased PB:N ratio. When the PB:N ratio proposed by Belenguer et al. (2002) was used in the present experiment, both MNF (g/d) and efficiency (g of N/kg of RDOM) would be within the range of those calculated by others (data not shown). This underlines the importance of using an adequate and representative bacterial pellet to calculate the MNF, and to determine the PB:N values in different pellets, animal species, and diets.

Our results show that the magnitude of the effect of shifting the F:C from 70:30 to 30:70 in goat diets depends on the forage type. With A, the benefit of increasing concentrate level in the diet, especially in terms of achieving greater urinary PD excretion and greater N retention efficiency, was less evident than in the case of G. This could be explained by the greater CP content and digestibility in legume vs. G forages. Therefore, low-concentrate diets (70:30, F:C) may not have detrimental effects on N metabolism if good quality forages such as A are used. The MNF estimated in goats fed different diets was influenced by the bacterial pellet of choice (LAB or SAB). In addition, the observed PB:N values were different from those reported in the literature, which underlines the need for these parameters to be analyzed directly in pellets isolated from specific animals and experimental conditions.

## LITERATURE CITED

- Antoniou, T., and M. Hadjipanayiotou. 1985. The digestibility by sheep and goats of five roughages offered alone or with concentrates. *J. Agric. Sci.* 105:663–671.
- AOAC. 1999. *Official Methods of Analysis*. 17th ed. AOAC Int., Arlington, VA.
- ARC. 1984. *The Nutrient Requirement of Ruminant Livestock (No.1)*. Commonw. Agric. Bureaux, Slough, UK.
- Archimède, H., D. Sauvant, J. Hervieu, C. Poncet, and M. Dorleans. 1995. Digestive interactions in the ruminant relationships between whole tract and stomach evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 54:327–340.
- Archimède, H., D. Sauvant, J. Hervieu, F. Ternois, and C. Poncet. 1996. Effects of the nature of roughage and concentrate and their proportion on ruminal characteristics of non lactating goats, consequences on digestive interactions. *Anim. Feed Sci. Technol.* 58:267–282.
- Bach, A., S. Calsamiglia, and M. D. Stern. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 88:E9–E21.
- Balcells, J., J. A. Guada, C. Castrillo, and J. Gasa. 1993. Rumen digestion and urinary excretion of purine derivatives in response to urea supplementation of sodium-treated straw fed to sheep. *Br. J. Nutr.* 69:721–732.
- Balcells, J., J. A. Guada, J. M. Peiró, and D. S. Parker. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 575:153–157.
- Belenguer, A., D. Yáñez, J. Balcells, N. H. Ozdemir Baber, and M. González Ronquillo. 2002. Urinary excretion of purine derivatives and prediction of rumen microbial outflow in goats. *Livest. Prod. Sci.* 77:127–135.
- Castel, J. M., Y. Mena, M. Delgado-Pertíñez, J. Camúñez, J. Baulto, F. Caravaca, J. L. Guzmán, and M. J. Alcalde. 2003. Characterisation of semi extensive goat production systems in Southern Spain. *Small Rumin. Res.* 47:1–11.
- Cecava, M. J., N. R. Merchen, L. C. Gay, and L. L. Berger. 1990. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. *J. Dairy Sci.* 73:2480–2488.
- Cerrillo, M. A., J. R. Russell, and M. H. Crump. 1999. The effects of hay maturity and forage to concentrate ratio on digestion kinetics in goats. *Small Rumin. Res.* 32:51–60.
- Chen, X. B., Y. K. Chen, M. F. Franklin, E. R. Orskov, and W. J. Shand. 1992. The effect of feed intake and body weight on purine derivative excretion and microbial protein supply in sheep. *J. Anim. Sci.* 70:1534–1542.
- Chen, X. B., F. D. De, B. Hovell, E. R. Orskov, and D. S. Brown. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants: Effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. *Br. J. Nutr.* 63:131–142.
- Craig, W. M., G. A. Broderick, and D. B. Ricker. 1987. Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. *J. Nutr.* 117:56–62.
- Dehority, B. A. 1984. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:182–185.
- Dehority, B. A. 2003. *Rumen Microbiology*. Nottingham Univ. Press, Nottingham, UK.
- Delgado, C., M. Rosegrant, H. Steinfield, S. Ehui, and C. Courbois. 1999. *Livestock to 2020: The next food revolution*. IFPRI Brief 61. Int. Food Policy Res. Inst., Washington, DC.
- Dennis, S. M., M. J. Arambel, E. E. Bartley, and A. D. Dayton. 1983. Effect of energy concentration and source of nitrogen on numbers and types of rumen protozoa. *J. Dairy Sci.* 66:1248–1254.
- Eugene, M., H. Archimède, and D. Sauvant. 2004. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livest. Prod. Sci.* 85:81–97.
- FAO. 2008. Significant increase in world cereal production forecast for 2008, but prices remain high. <http://www.fao.org/newsroom/en/news/2008/1000783/index.html>. Accessed May 13, 2008.
- Fimbres, H., J. R. Kawas, G. Hernández-Vidal, J. F. Picón-Rubio, and C. D. Lu. 2002. Nutrient intake, digestibility, mastication and ruminal fermentation of lambs fed finishing ration with various forage levels. *Small Rumin. Res.* 43:275–281.
- Firkins, J. L., L. L. Berger, N. R. Merchen, G. C. Fahey Jr., and R. L. Mulvaney. 1987. Ruminal nitrogen metabolism in steers as affected by feed intake and dietary urea concentration. *J. Dairy Sci.* 70:2302–2311.
- Franzolin, R., and B. A. Dehority. 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *J. Anim. Sci.* 74:2803–2809.
- Fujihara, T., M. N. Shem, and K. Nakamura. 2005. Effect of dietary energy levels on the urinary excretion of purine derivatives in sheep. *Anim. Sci. J.* 76:441–445.
- Fujita, T., M. Kajita, and H. Sano. 2006. Responses of whole body protein synthesis, nitrogen retention and glucose kinetics to supplemental starch in goats. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Chem.* 144:180–187.
- Grant, R. J., and D. R. Mertens. 1992. Influence of buffer pH and raw corn starch addition on in vitro fiber digestion kinetics. *J. Dairy Sci.* 75:2762–2768.
- Grubb, J. A., and B. A. Dehority. 1975. Effects of an abrupt change in ration from all roughage to high concentrate upon rumen

- microbial numbers in sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 30:404–412.
- Hadjipanayiotou, M., and T. Antoniou. 1983. A comparison of rumen fermentation patterns in sheep and goats given a variety of diets. *J. Sci. Food Agric.* 34:1319–1322.
- Harrison, D. G., D. E. Beever, and D. F. Osbourn. 1979. The contribution of protozoa to the protein entering the duodenum of sheep. *Br. J. Nutr.* 41:521–527.
- Isac, M. D., M. A. García, J. F. Aguilera, and E. Molina-Alcaide. 1994. A comparative study of nutrient digestibility, kinetics of digestion and passage and rumen fermentation pattern in goats and sheep offered medium quality forages at the maintenance level of feeding. *Arch. Tierernähr.* 46:37–50.
- Kang-Meznarich, J. H., and G. A. Broderick. 1981. Effects of incremental urea supplementation on ruminal ammonia concentration and bacterial protein formation. *J. Anim. Sci.* 51:422–431.
- Kawas, J. R., W. H. Schacht, J. M. Shelton, E. Olivares, and C. D. Lu. 1999. Effects of grain supplementation on the intake and digestibility of range diets consumed by goats. *Small Rumin. Res.* 34:49–56.
- Littell, R. C., P. R. Henry, and C. B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76:1216–1231.
- 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.
- Matejovsky, K. M., and D. W. Sanson. 1995. Intake and digestion of low-, medium-, and high- quality grass hays by lambs receiving increasing levels of corn supplementation. *J. Anim. Sci.* 73:2156–2163.
- Molina-Alcaide, E., A. I. Martín-García, and J. F. Aguilera. 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.
- Morand-Fehr, P., and D. Sauvant. 1987. Feeding strategies in goats. Pages 1275–1303 in *Proc. 4th Int. Conf. Goats, Brasilia, Brazil*. O. P. Santana, A. G. da Silva, and W. C. Foote, ed. Depto. de Difusao de Tecnol., Brasilia, Brazil.
- Mota, M., J. Balcells, N. H. Ozdemir Baber, S. Bölüktepe, and A. Belenguer. 2008. Modelling purine derivative excretion in dairy goats: Endogenous excretion and the relationship between duodenal input and urinary output. *Animal* 2:44–51.
- Obispo, N. E., and B. A. Dehority. 1999. Feasibility of using total purines as a marker for ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.* 77:3084–3095.
- Pérez, J. F., J. Balcells, J. A. Cebrián, and S. M. Martín-Orúe. 1998. Excretion of endogenous and exogenous purine derivatives in sheep: Effect of increased concentrate intake. *Br. J. Nutr.* 79:237–240.
- 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. *Br. J. Nutr.* 75:699–709.
- Pinos-Rodríguez, J. M., S. S. González, G. D. Mendoza, R. Bárcena, M. A. Cobos, A. Hernández, and M. E. Ortega. 2002. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 80:3016–3020.
- Prieto, C., J. F. Aguilera, L. Lara, and J. Fonollá. 1990. Protein and energy requirements for maintenance of indigenous Granadina goats. *Br. J. Nutr.* 63:155–163.
- Ramanzin, M., L. Bailoni, and S. Schiavon. 1997. Effect of forage to concentrate ratio on comparative digestion in sheep, goats and fallow deer. *Anim. Sci.* 64:163–170.
- Ranilla, M. J., and M. D. Carro. 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.
- Rotger, A., A. Ferret, S. Calsamiglia, and X. Manteca. 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 diets. *J. Anim. Sci.* 84:1188–1196.
- Santoso, B., A. Kilmaskossu, and P. Sambodo. 2007. Effects of saponin from *Biophytum petersianum* Klotzsch on ruminal fermentation, microbial protein synthesis and nitrogen utilization in goats. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137:58–68.
- Santra, A., S. A. Karim, A. S. Mishra, O. H. Chaturvedi, and R. Prasad. 1998. Rumen ciliate protozoa and fibre digestion in sheep and goats. *Small Rumin. Res.* 30:13–18.
- Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. *J. Anim. Sci.* 43:910–929.
- Smith, R. H., A. B. McAllan, D. Hewitt, and P. E. Lewis. 1978. Estimation of amounts of microbial and dietary nitrogen compounds entering the duodenum of cattle. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 90:557–568.
- Tilley, J. M. A., and R. A. Terry. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18:104–111.
- Van Niekerk, B. D. H., A. Bensadoun, O. L. Paladines, and J. T. Reid. 1963. A study of some of the conditions affecting the rate of excretion and stability of creatinine in sheep urine. *J. Nutr.* 79:373–380.
- 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.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39:971–974.
- Williams, A. G., and G. S. Coleman. 1991. *The Rumen Protozoa*. Springer-Verlag New York Inc., New York, NY.
- Yáñez-Ruiz, D. R., A. Moumen, A. I. Martín-García, and E. Molina-Alcaide. 2004. Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: Effect of PEG supply. *J. Anim. Sci.* 82:2023–2032.
- Yáñez-Ruiz, D. R., N. D. Scollan, R. J. Merry, and C. J. Newbold. 2006. Contribution of rumen protozoa to duodenal flow of nitrogen, conjugated linoleic acid and vaccenic acid in steers fed silages differing in their water-soluble carbohydrates content. *Br. J. Nutr.* 96:861–869.

**PUBLICACIÓN 3**

**Experimento 2**

**(Journal of Animal Science. En revisión)**

Evaluación de la capacidad de los fermentadores de flujo simple continuo para simular los efectos del tipo de forraje y de la relación forraje:concentrado sobre la fermentación ruminal en cabras

**Evaluation of the ability of single-flow continuous-culture fermenters to simulate the effects of forage type and forage to concentrate ratio on goats ruminal fermentation**



**Evaluation of the ability of single-flow continuous-culture fermenters to simulate the effects of forage type and forage to concentrate ratio on goats ruminal fermentation.**

G. Cantalapiedra-Hijar, D.R. Yáñez-Ruiz, and E. Molina-Alcaide

**ABSTRACT:** To evaluate the ability of single-flow continuous-culture fermenters (SFCCF) to simulate the effects of forage type (F) and forage to concentrate (CONC) ratio (F:C) on nutrient digestibility, ruminal fermentation and N metabolism, an *in vitro* trial was carried out using 8 SFCCF according to two independent 4 x 4 Latin square design experiments. In addition, the composition of the liquid- (LAB) and solid- (SAB) associated bacteria isolated from the rumen and SFCCF was also compared. Dietary treatments were a 2 x 2 factorial arrangement of F (grass vs. alfalfa hay) and F:C (70:30 vs. 30:70). Each experimental diet was supplied at either 30 or 45 g DM per fermenter, resulting in 8 treatments allocated within one of the two 4 x 4 Latin square design experiment according to the amount of diet supplied. The SFCCF with high input had lower ( $P < 0.001$ ) pH values (from 5.70 to 6.08) than those with low input (from 6.22 to 6.53). The low pH associated with input of 45 g DM provoked a bad simulation of the nutrient digestion, especially that of NDF, and also failed to simulate some of the ruminal fermentation parameters like the pH and VFA yield. However, the SFCCF with low pH could reproduce most of the N metabolism measurements as well as evolution over time of pH, ammonia-N and VFA concentration previously studied *in vivo* (Diet x Origin x Time;  $P \geq 0.18$ ). The F:C effect was adequately simulated in SFCCF ran at a high pH on most of the analysed parameters, and when the simulation was not perfectly achieved, like in the case of the non-fibrous carbohydrate digestion and the acetate to propionate ratio, discrepancies between fermenters and the rumen were observed only for low CONC diets (F:C 70:30). On the other hand, the F effect was not well simulated for some parameters like the NDF digestibility, pH and VFA molar proportions. Unlike in LAB, guanine and total purine bases

contents and the purine bases:N ratio were lower ( $P < 0.001$ ) in SAB from SFCCF than from the rumen. The results indicated that SFCCF are an adequate tool to study ruminal fermentation parameters as long as the pH is not low, and that the F:C effect was better simulated than the F effect. It seems that the higher the quality of diets used in SFCCF, the better the simulation that can be achieved.

**Key Words:** digestibility, *in vitro* simulation, microbial growth, ruminal fermentation, single-flow continuous-culture fermenters.

## INTRODUCTION

Continuous-culture fermenters (**CCF**) have been used in nutritional research (Griswold *et al.*, 2003; Castillejos *et al.*, 2005) for the study of ruminal fermentation under conditions that closely simulate the rumen environment, thus avoiding the use of surgical procedures and the high costs and variability associated with *in vivo* trials. However, despite an increased interest in *in vitro* methodologies, direct comparisons of *in vivo* and *in vitro* approaches are limited and most studies have been conducted with cattle and dual-flow CCF (Hannah *et al.*, 1989; Mansfield *et al.*, 1995; Muetzel *et al.*, 2009). Results obtained with cattle may not be directly extrapolated to small ruminants, and information in this respect is very scarce (Carro *et al.*, 2009; Molina-Alcaide *et al.*, 2009). In studies with CCF DM inputs ranging from 15 (Molina-Alcaide *et al.*, 1996) to 90 (Slyter and Rumsey, 1991) g DM/d/L of effective volume have been employed. Concerning pH in fermenters different conditions have been also used: some works set at a constant pH value (Dahlberg *et al.*, 1988), others set the pH within a physiological range (Molina-Alcaide *et al.*, 1996) or even did not regulate pH (Muetzel *et al.*, 2009). Since the pH has a strong impact on rumen fermentation (Calsamiglia *et al.*, 2008), it seems to be an essential parameter to consider in rumen simulations *in vitro*.

Therefore, the aim of this work was to evaluate the ability of single-flow CCF (**SFCCF**) to simulate the ruminal metabolism using 2 different inputs: 30 or 45 g DM per d. The evaluation was carried out by comparing the *in vitro* effects of forage type (**F**) and forage to concentrate (**CONC**) ratio (**F:C**) on digestibility, ruminal fermentation and microbial growth with previously published

measurements in rumen-cannulated goats fed the same diets (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009). As part of this evaluation we also compare the *in vivo* vs. *in vitro* liquid- (**LAB**) and solid- (**SAB**) associated bacteria composition.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Animals and diets***

Four adult dry non-pregnant Granadina goats ( $46.3 \pm 2.96$  kg BW) fitted with permanent ruminal cannulas were used as rumen inoculum donors. Animals were fed and maintained as previously described (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009). Four experimental diets composed (DM basis) of 70% grass hay (G) and 30% CONC (GF), 30% G and 70% CONC (GC), 70% alfalfa hay (A) and 30% CONC (AF), and 30% A and 70% CONC (AC) were assayed.

### ***Fermenters and experimental procedure***

Eight SFCCF (Miettinen and Setälä, 1989) were used in two independent 4 x 4 Latin square design experiments with a 2 x 2 factorial arrangement of treatments, forage type (G vs. A) and level of concentrate (70:30 vs. 30:70, F:C). Each experimental diet was supplied twice at day (0900 and 1500 h) at 30 or 45 g DM per fermenter, resulting in 8 treatments allocated within one of the two 4 x 4 Latin square design experiment according to the amount of diet supplied. Rumen content was collected 2 h after feeding from each goat previously adapted to the same experimental diets for 21 d, immediately transported to the laboratory into thermal bottles, and strained through 4 layers of cheesecloth. The filtrate from each goat was used within 30 min after collection to inoculate 2 fermenters (700 mL per fermenter) which received the same diet as the donor animal. Four identical 12-d incubation runs were carried out. Experimental treatments were assigned randomly within each experimental run so that each treatment was conducted in 4 fermenters. Flow through fermenters was maintained by continuous infusion of McDougall (1948) artificial saliva to achieve an average outflow rate of 5.33%, and CO<sub>2</sub> was continuously infused to maintain anaerobic conditions. Effluent from each fermenter was collected into a vessel maintained in a 3<sup>o</sup> C bath to prevent microbial growth. Each incubation run consisted of 7 d for adaptation and 5 d for sampling. Every



day effluents were removed and their weight and volume were recorded. The pH in the fermentation flask was measured twice a day immediately before feeding. From d 8 through d 11 effluent was collected, filtered through 4 layers of cheesecloth, two-5 mL aliquots were taken for NH<sub>3</sub>-N and VFA analyses, and stored at - 20 °C. At the end of the trial, composite sub-samples from these 3 sampling days were made, one aliquot for total N determination was collected and the remainder was freeze-dried and analyzed for DM, OM, NDF, ether extract and purine bases (**PB**) content in order to determine the *in vitro* nutrient digestibility of diets and microbial yield.

On d 11, 25 mL samples were individually collected from the fermenter contents at 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h after the morning feeding and squeezed through 4 layers of cheesecloth. The pH was measured immediately and 2 aliquots were taken at each time to analyze NH<sub>3</sub>-N and VFA concentrations. On d 12, total effluent was collected for total bacteria (**EB**) isolation. On the same day the content of fermenters fed 45 g DM was also collected 2 h after the morning feeding and used for the isolation of LAB and SAB pellets (Martín-Orúe *et al.*, 1998). Methylcellulose was used for detaching bacteria from particles. Regarding EB pellet isolation, a similar procedure was carried out but filtrates for LAB and SAB pellets were combined and centrifuged in order to obtain a pellet of total bacteria. Bacterial pellets isolated from SFCCF as well as LAB and SAB previously isolated from goats fed the same diets (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009) were freeze-dried and ground to a fine powder with a mortar and pestle before DM, OM, N and PB (guanine and adenine) content analyses.

### **Chemical analyses**

Dry matter (method ID 934.01), ash (method ID 942.05), and N (method ID 984.13) in samples of diet ingredients, effluents and bacterial pellets were determined according to the Association of Official Analytical Chemists (2005). The NDF 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, Macedon, NY, USA). The  $\alpha$ -amylase was used for NDF analysis in concentrate and effluent samples, and both NDF and ADF were expressed exclusive of residual ash. The ADL of diet ingredients was determined by

solubilization of cellulose with 75% sulphuric acid. Ether extract (method ID 7.045) was analyzed in diet ingredients and effluent samples. *In vitro* DM and OM digestibility of diet ingredients was determined according to the procedure described by Tilley and Terry (1963), using an ANKOM Daisy Incubator (Macedon, NY).

Aliquots of strained fermenters' content and effluent were thawed in the refrigerator overnight, centrifuged at 4° C and 20,000 × g for 20 min and the supernatant was analyzed for VFA and NH<sub>3</sub>-N. Individual VFA were analyzed (Isac *et al.*, 1994) by gas chromatography. The NH<sub>3</sub>-N concentration was determined by a colorimetric method (Weatherburn, 1967).

Purine bases (guanine and adenine) in effluents and bacterial pellets isolated from SFCCF and goat's rumen were determined following the method described by Balcells *et al.* (1992), using HPLC, which consisted of a multisolvent delivery system (model 510; Waters, Millipore), an injector (Waters<sup>TM</sup> 717 plus Autosampler, Waters), a multiwavelength detector (model 481; Lambda-Max, LC Spectrophotometer, Waters, set to 205 nm) and a double 4.0 mm x 250 mm C18 ODS-2 analytical column (Waters Spherisorb®). Purine bases were quantified by peak integration using the Waters HPLC systems software Millenium32.

### ***Calculations and statistical analyses***

The OM digestibility in fermenters was calculated as described by Crawford *et al.* (1980) with corrections for buffer salt lost during freeze-drying. True *in vitro* digestibility was calculated by subtracting the estimated microbial OM mass from OM digestibility. The non fibrous carbohydrate (**NFC**) was calculated as:  $NFC = OM - (NDF + CP + \text{ether extract})$ . Daily microbial N flow (**MNF**) was estimated in each fermenter by multiplying total non-ammonia N (**NAN**) output by the PB:N ratio in the effluent / PB:N in EB.

Data were analyzed by the GLM procedure of SPSS for WINDOWS®, version 15.0 (SPSS Inc., 2007, Chicago, IL). The model included forage type, forage:concentrate ratio and forage type x forage:concentrate ratio interaction as fixed effects, whereas the fermenter and period were considered as random effects. However, when the bacterial pellet composition *in vitro* was compared

with previous data obtained *in vivo* (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009) the fixed effects were origin, pellet and their interaction. Data corresponding to fermenter contents obtained at different times after feeding were analyzed taking into account the correlation among repeated measures from the same fermenter (animal), and accordingly a linear mixed model procedure (Littell *et al.*, 1998) was used rather than GLM. The linear mixed model included the same fixed effects described for the GLM model, except that time after feeding and its interaction with main factors were included (Rotger *et al.*, 2006). The *in vitro* fermentation parameters response over time were compared with that previously obtained *in vivo* (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009) by using the same linear mixed model procedure but with diet, origin, time after feeding and their interactions as fixed effects. Effects were considered significant at  $P < 0.05$ . Differences among means with  $0.05 < P < 0.10$  were accepted as representing tendencies to differences. When significant differences were detected, differences among means were tested using Tukey's comparison test.

## RESULTS AND DISCUSSION

Daily outputs in fermenters expressed as amounts of product cannot be directly compared with *in vivo* outflows, but such results could be very helpful when comparisons are made within a given experiment, as stated by Czerkawski and Bredenrickge (1977). Because the absolute inputs and outputs in fermenters and rumen often differ in numerical magnitude, the objective of the present study was not to statistically compare *in vivo* vs. *in vitro* data, but to evaluate the ability of SFCCF to simulate the F and F:C effects as well as their interaction on different *in vivo* parameters (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009). Previous *in vivo* vs. *in vitro* comparative studies (Hannah *et al.*, 1986; Mansfield *et al.*, 1995; Muetzel *et al.*, 2009; Carro *et al.*, 2009) have focused on concentrations or proportions in order to avoid differences in DM inputs between animals and fermenters. However, the different amount of diet:volume ratios in the rumen and in fermenters may also influence concentrations and proportions (Carro *et al.*, 2009). The incubations in the present study were run in SFCCF at 2 different inputs: low (30 g DM/d) or high (45 g DM/d). The average pH induced in the fermenters was highly influenced by the input level:

SFCFF with high input had lower ( $P < 0.001$ ; data not shown) pH values (from 5.70 to 6.08) than those in SFCCF with low input (from 6.22 to 6.53). Because the pH has a significant impact on fermentation (de Veth and Kolver, 2001; Calsamiglia *et al.*, 2008), the effects of the input level and pH will be we discussed together in this paper. From here on, fermenters fed 30 and 45 g DM are also referred to as fermenters with high and low pH, respectively.

### Diets

Composition and *in vitro* digestibility of diet ingredients are shown in Table 1. Grass hay was lower in CP and higher in NDF than A and CONC. *In vitro* CP digestibility values for CONC, A and G were 81.7, 78.9 and 68.4 %, respectively. Differences between both forages along with different levels of CONC allowed formulating 4 different practical diets.

**Table 1.** Chemical composition (g/kg DM) and *in vitro* digestibility (%) of diet ingredients.

| Item                                | Grass hay | Alfalfa hay | Concentrate |
|-------------------------------------|-----------|-------------|-------------|
| DM, g/kg fresh matter               | 904       | 895         | 899         |
| OM                                  | 933       | 893         | 905         |
| CP                                  | 94.7      | 192         | 199         |
| Ether extract                       | 16.1      | 14.9        | 33.1        |
| NDF                                 | 506       | 428         | 329         |
| ADF                                 | 273       | 320         | 131         |
| ADL                                 | 39.2      | 73.0        | 27.0        |
| GE, MJ/kg DM                        | 18.7      | 18.3        | 18.2        |
| IVDMD, %                            | 60.3      | 66.4        | 78.0        |
| <i>In vitro</i> OM digestibility, % | 60.1      | 65.4        | 78.3        |
| <i>In vitro</i> CP digestibility, % | 68.4      | 78.9        | 81.7        |

### Nutrient digestibility

Nutrient digestibility, calculated from this *in vitro* experiment, is not numerically comparable with previous *in vivo* digestibility (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009) since the former refers exclusively to the rumen fermentability of diets and the latter take into account the digestion and absorption of nutrients along the whole intestinal tract. However, since both parameters are highly correlated (ARC, 1984) the comparative analysis of the studied effects on these

parameters will allow the examination of the potential of fermenters to digest the experimental diets in a manner similar to the goat's rumen.

As shown in Table 2, high CONC diets (GC and AC) promoted greater ( $P \leq 0.003$ ) apparent and true OM digestibility as well as NDF digestibility than low CONC ones (GF and AF) as long as the SFCCF ran at high pH. Increasing CONC in diets has been proven to have a positive effect on OM and NDF digestibility in goats fed the same diets (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009). Moreover, the positive effect of increasing the level of CONC has been reported elsewhere on DM and OM digestibility in goats (Ramanzin *et al.*, 1997; Cerrillo *et al.*, 1999; Fimbres *et al.*, 2002), and on true DM digestibility in SFCCF (Carro *et al.*, 2009) and dual-flow CCF (Stokes *et al.*, 1991). On the other hand the NDF digestibility increased as CONC did in some *in vivo* studies with goats (Cerrillo *et al.*, 1999) but not in others (Antoniou and Hadjipanayiotou, 1985), whereas in CCF was either increased (Stokes *et al.*, 1991), decreased (Mansfield *et al.*, 1995) or unchanged (Rodriguez-Prado *et al.*, 2004; Carro *et al.*, 2009). Controversial results are likely associated to the pH values reached with each CONC diet. The apparent NDF digestibility in fermenters with high pH was greater ( $P < 0.001$ ; data not shown) than in fermenters with low pH, which is in accordance with observations from studies examining the effect of pH on fiber digestibility in CCF (de Veth and Kolver, 2001; Wales *et al.*, 2004; Calsamiglia *et al.*, 2002). This may be due to a reduction in the ability of fibrolytic bacteria to attach to feed particles (Cheng *et al.*, 1980), a slow replication rate of fibrolytic bacteria under low pH (Russell and Dombrowski, 1980), or both. In addition, Pitt *et al.* (1996) reported a pH threshold of 6.2, below which the growth of fiber-degrading microbes was depressed. Therefore, it seems that the worse ability of SFCCF fed 45 g DM to simulate the F:C effect on NDF digestibility in comparison to those fed 30 g DM could be due to the pH-related factors mentioned before and as long as SFCCF had a high pH, high CONC levels improved both the OM and NDF digestibility of studied nutrients in a similar manner to the goat's rumen. Regarding the F effect, similar ( $P \geq 0.48$ ) apparent OM digestibility was found in diets based on G and A in SFCCF fed 30 and 45 g DM, in accordance to the close *in vitro* OM digestibility values found for both forages (Table 1) and in agreement with similar apparent digestibility of diets based on forages G and A reported in goats (Cantalapiedra-Hijar *et al.*,

2009). In contrast, as digestibility was corrected for bacterial OM, the F effect depended on the CONC level in diets (F x F:C interaction;  $P \leq 0.06$ ). For instance, in SFCCF with low inputs the F effect only affected ( $P < 0.05$ ) low CONC diets and not ( $P > 0.05$ ) high CONC ones. Because the true digestibility relies upon the microbial biomass, this interaction seemed to be invoked by differences ( $P < 0.05$ ) between low CONC diets (GF and AF) in MNF (see below). The NDF digestibility was unaffected by F ( $P \geq 0.11$ ) in SFCCF with both high and low pH, which did not occur in goat's rumen (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009). Therefore, there seems to be a non-pH related failure in SFCCF to simulate adequately the F effect on fiber digestibility found *in vivo* (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009).

On the other hand, high CONC diets had higher ( $P < 0.05$ ) NFC digestibility only as G was the forage used (F x F:C interaction,  $P \leq 0.08$ ) with both high and low inputs, while that calculated in goats (unpublished data) receiving the same diets was higher ( $P = 0.009$ ) in high CONC diets regardless the forage used. This finding could support the hypothesis of different potential of CCF to simulate some *in vivo* parameters according to the quality of diets assayed. In this sense, Mansfield *et al.* (1995) found similar NFC digestibility in dual-flow CCF and the rumen fed the same diets only as low CONC diets was compared, while as high CONC diets were fed there were differences between *in vivo* and *in vitro*.

### **Ruminal fermentation**

The lack of metabolites absorption and recycling, together with a constant input of buffer regardless of the nature and amount of feedstuff supplied to the fermenters, might cause a different response to both F and F:C in SFCCF compared to *in vivo* results (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009). However, the average pH (Table 3) was lower ( $P < 0.001$ ) in SFCCF with high vs. low CONC diets, regardless of the amount of feedstuff received and agreed with previous *in vivo* results using the same diets (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009). Thus, although the buffering capacity was not adequately reproduced in SFCCF the F:C effect on pH was simulated likewise in the goat's rumen. This is in accordance with the observations by Carro *et al.* (2009) in a comparative study between SFCCF and sheep fed two diets differing in the F:C ratio.

**Table 2.** Effect of forage (F) and forage:concentrate ratio (F:C) on nutrient digestibility in single flow continuous-culture fermenters (SFCCF) fed the experimental diets at two different inputs (30 or 45 g DM).

| Items <sup>2</sup>                         |                               | Diets <sup>1</sup> |                    |                   |                   | SEM  | P-value |         |         |
|--|-------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------|---------|---------|---------|
|  |                               | GF                 | AF                 | GC                | AC                |      | F       | F:C     | F x F:C |
| Apparent OM digestibility, %               | Low input SFCCF <sup>3</sup>  | 38.9 <sup>a</sup>  | 40.7 <sup>a</sup>  | 44.1 <sup>b</sup> | 44.0 <sup>b</sup> | 0.58 | 0.48    | 0.003   | 0.46    |
|  | High input SFCCF <sup>4</sup> | 38.4               | 38.7               | 40.7              | 40.5              | 0.55 | 0.98    | 0.07    | 0.80    |
| True OM digestibility <sup>5</sup> , %     | Low input SFCCF               | 51.8 <sup>a</sup>  | 57.3 <sup>b</sup>  | 63.2 <sup>c</sup> | 63.8 <sup>c</sup> | 0.47 | 0.007   | < 0.001 | 0.03    |
|  | High input SFCCF              | 49.7 <sup>a</sup>  | 52.6 <sup>ab</sup> | 56.7 <sup>b</sup> | 55.6 <sup>b</sup> | 0.52 | 0.41    | < 0.001 | 0.06    |
| NDF digestibility, %                       | Low input SFCCF               | 49.6 <sup>a</sup>  | 51.3 <sup>a</sup>  | 57.2 <sup>b</sup> | 58.9 <sup>b</sup> | 0.54 | 0.30    | < 0.001 | 0.63    |
|  | High input SFCCF              | 44.3               | 40.2               | 45.8              | 42.1              | 0.85 | 0.11    | 0.12    | 0.83    |
| Apparent NFC <sup>6</sup> digestibility, % | Low input SFCCF               | 41.5 <sup>a</sup>  | 49.7 <sup>b</sup>  | 55.1 <sup>b</sup> | 58.4 <sup>b</sup> | 1.84 | 0.009   | 0.04    | 0.05    |
|  | High input SFCCF              | 38.1 <sup>a</sup>  | 48.0 <sup>b</sup>  | 53.7 <sup>b</sup> | 54.0 <sup>b</sup> | 1.62 | 0.02    | 0.03    | 0.08    |

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

<sup>1</sup> GF = 70% grass hay and 30% concentrate, DM basis; GC = 30% grass hay and 70% concentrate, DM basis; AF = 70% alfalfa hay and 30% concentrate, DM basis; AC = 30% alfalfa hay and 70% concentrate, DM basis

<sup>2</sup> Observations, n = 4

<sup>3</sup> Single-flow continuous-culture fermenters with high pH resulting from low input (30 g DM) of the experimental diets

<sup>4</sup> Single-flow continuous-culture fermenters with low pH resulting from high input (45 g DM) of the experimental diets

<sup>5</sup> Calculated deducting microbial OM from effluents

<sup>6</sup> Calculated as  $NFC = OM - (NDF + CP + \text{ether extract})$

Forage type had no effect on pH ( $P = 0.16$ ) in SFCCF with low input and in goat's rumen fed the same diets (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009) unlike in those with high input ( $P < 0.001$ ). Because saliva flux through the fermentation flasks was identical for every diet, input of 45 g DM in SFCCF could overcome the buffering capacity of artificial saliva and thus the different VFA yield ( $P < 0.001$ ) promoted by diets based on A and G affect pH in the same way.

Total VFA concentration is expected to be higher in CCF than in the rumen because of the lack of absorption *in vitro* (Hannah *et al.*, 1986; Mansfield *et al.*, 1995; Devant *et al.*, 2001), but it depends ultimately on the amount of DM supplied to the fermenters as shown in Table 3. Diets based on A promoted greater ( $P < 0.001$ ) VFA concentrations than those based on G in SFCCF with low input, and this finding was previously reported in the *in vivo* experiment using the same diets (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009) and with identical arrangement of values. Neither the goat's rumen in that *in vivo* study nor the SFCCF with low input in this study had a significant F:C effect ( $P \geq 0.66$ ), in disagreement with the comparative study made by Carro *et al.* (2009), where only SFCCF, and not animals, detected differences in VFA concentration when fed diets differing in the F:C. Results from dual-flow CCF (Stokes *et al.*, 1991; Rodriguez-Prado *et al.*, 2004) showed higher VFA concentration as the level of CONC increased in diets.

Differences between fermenters fed 30 and 45 g DM could be attributed to a pH effect, which accounts for up to 56% of total VFA concentration variability in dual-flow CCF (Calsamiglia *et al.*, 2008). Changes in the F:C ratio in ruminant diets have been reported to alter the relative proportions of VFAs (Church, 1976; Cerrillo *et al.*, 1999). The molar proportions of acetate and propionate, as well as the A:P ratio, were affected ( $P < 0.001$ ) by the level of CONC as previously found in goat's rumen fed the same diets (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009). Similar results were achieved in the comparative study made by Carro *et al.* (2009) between SFCCF and sheep. However, the extent to which the A:P ratio decreased in SFCCF as the level of CONC increased was different for diets based on G vs. A (F x F:C interaction;  $P < 0.001$ ) unlike in the rumen, and this could be due to differences ( $P < 0.05$ ) found between low CONC diets (GF and AF) only significant in SFCCF and not in the goat's rumen (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009).



**Table 3.** Effect of forage (F) and forage:concentrate ratio (F:C) on pH, total VFA concentration and individual molar proportions in single-flow continuous-culture fermenters (SFCCF) fed the experimental diets at two different inputs (30 or 45 g DM).

| Items <sup>2</sup>            |                               | Diets <sup>1</sup> |                   |                   |                   | SEM   | P-value |         |         |
|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|---------|---------|---------|
|                               |                               | GF                 | AF                | GC                | AC                |       | F       | F:C     | F × F:C |
| pH                            | Low input SFCCF <sup>3</sup>  | 6.50 <sup>b</sup>  | 6.53 <sup>b</sup> | 6.22 <sup>a</sup> | 6.31 <sup>a</sup> | 0.018 | 0.16    | < 0.001 | 0.23    |
|                               | High input SFCCF <sup>4</sup> | 6.08 <sup>d</sup>  | 5.79 <sup>b</sup> | 5.94 <sup>c</sup> | 5.70 <sup>a</sup> | 0.013 | < 0.001 | < 0.001 | 0.29    |
| Total VFA, mmol/L             | Low input SFCCF               | 112 <sup>a</sup>   | 126 <sup>b</sup>  | 115 <sup>a</sup>  | 120 <sup>ab</sup> | 1.3   | < 0.001 | 0.66    | 0.11    |
|                               | High input SFCCF              | 142 <sup>a</sup>   | 174 <sup>b</sup>  | 173 <sup>b</sup>  | 166 <sup>b</sup>  | 1.5   | < 0.001 | < 0.001 | <0.001  |
| Molar proportion, mol/100 mol |                               |                    |                   |                   |                   |       |         |         |         |
| Acetate                       | Low input SFCCF               | 63.9 <sup>ab</sup> | 65.1 <sup>b</sup> | 62.1 <sup>a</sup> | 63.0 <sup>a</sup> | 0.25  | 0.04    | < 0.001 | 0.82    |
|                               | High input SFCCF              | 57.1 <sup>b</sup>  | 63.5 <sup>c</sup> | 49.7 <sup>a</sup> | 50.6 <sup>a</sup> | 0.33  | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |
| Propionate                    | Low input SFCCF               | 21.0 <sup>b</sup>  | 16.6 <sup>a</sup> | 22.4 <sup>c</sup> | 20.9 <sup>b</sup> | 0.21  | < 0.001 | < 0.001 | 0.001   |
|                               | High input SFCCF              | 22.3 <sup>a</sup>  | 21.8 <sup>a</sup> | 27.8 <sup>b</sup> | 28.7 <sup>b</sup> | 0.13  | 0.41    | < 0.001 | 0.007   |
| Butyrate                      | Low input SFCCF               | 11.8 <sup>a</sup>  | 12.8 <sup>b</sup> | 11.1 <sup>a</sup> | 11.0 <sup>a</sup> | 0.13  | 0.08    | < 0.001 | 0.02    |
|                               | High input SFCCF              | 16.8 <sup>bc</sup> | 9.93 <sup>a</sup> | 18.5 <sup>c</sup> | 15.2 <sup>b</sup> | 0.29  | < 0.001 | < 0.001 | 0.003   |
| A:P <sup>5</sup>              | Low input SFCCF               | 3.06 <sup>a</sup>  | 3.94 <sup>b</sup> | 2.85 <sup>a</sup> | 3.06 <sup>a</sup> | 0.038 | < 0.001 | <0.001  | < 0.001 |
|                               | High input SFCCF              | 2.57 <sup>b</sup>  | 2.92 <sup>c</sup> | 1.80 <sup>a</sup> | 1.77 <sup>a</sup> | 0.020 | < 0.001 | <0.001  | < 0.001 |

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

<sup>1</sup> GF = 70% grass hay and 30% concentrate, DM basis; GC = 30% grass hay and 70% concentrate, DM basis; AF = 70% alfalfa hay and 30% concentrate, DM basis; AC = 30% alfalfa hay and 70% concentrate, DM basis

<sup>2</sup> Observations, n = 28

<sup>3</sup> Single-flow continuous-culture fermenters with high pH resulting from low input (30 g DM) of the experimental diets

<sup>4</sup> Single-flow continuous-culture fermenters with low pH resulting from high input (45 g DM) of the experimental diets

<sup>5</sup> A:P=acetate:propionate

Since the diet composition was the same in SFCCF and in the *in vivo* experiment, and the interaction found in fermenters was not related to pH, differences might have been caused by other *in vitro*-related factors, such as different dilution rates that alter VFA proportions (Crawford *et al.*, 1980) or by sustaining different microbial species with different fermentation patterns, as suggested by Carro *et al.* (2009). Indeed, we have recently found, using molecular techniques, the presence of different bacterial communities in *in vivo* and *in vitro* systems fed the same diets (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2007; Soto *et al.*, 2009). A greater ( $P < 0.001$ ) molar proportion of butyrate was found with high CONC diets only in SFCCF with high input similar to the *in vivo* (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009) experiment. The molar proportions of acetate and propionate as well as the A:P ratio were affected by the F ( $P \leq 0.04$ ) in SFCCF with low input, while only acetate and the A:P ratio were affected in SFCCF with high input. In contrast, the F effect studied in the *in vivo* experiment (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009) did not follow the pattern described for *in vitro*, although the higher butyrate molar proportion for diets based on G compared to those based on A found *in vivo* was also significant ( $P < 0.001$ ) in SFCCF with high input. There seemed to be a better simulation of the F:C than the F effect for VFA molar proportions and also a better simulation with fermenters fed low input than high input, likely due to pH values (from 6.22 to 6.53) more comparable to those in the rumen (from 6.21 to 6.43).

The increase in the level of CONC from 30 % to 70 % increased ( $P < 0.05$ ) ruminal ammonia concentration in SFCCF (Table 4) only with diets based on G (F x F:C interaction,  $P \leq 0.002$ ). Results reported by Carro *et al.* (2009) showed lower  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentrations in SFCCF as CONC increased its proportion in diets based on forage A, which agrees with data from the present work in SFCCF with high input. In contrast, goats (Cerrillo *et al.*, 1999) and dual-flow CCF (Stokes *et al.*, 1991; Rodriguez-Prado *et al.*, 2004) did not show any decrease in  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentration as CONC increased. The F and F:C interaction ( $P < 0.001$ ) found in the present study was also found in goat's rumen fed the same diets (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009), and hence, it may indicate that SFCCF has the ability to simulate this fermentation parameter adequately. However, despite a similar arrangement of ammonia-N concentration values *in vitro* and *in vivo*, only diets based on A were within the

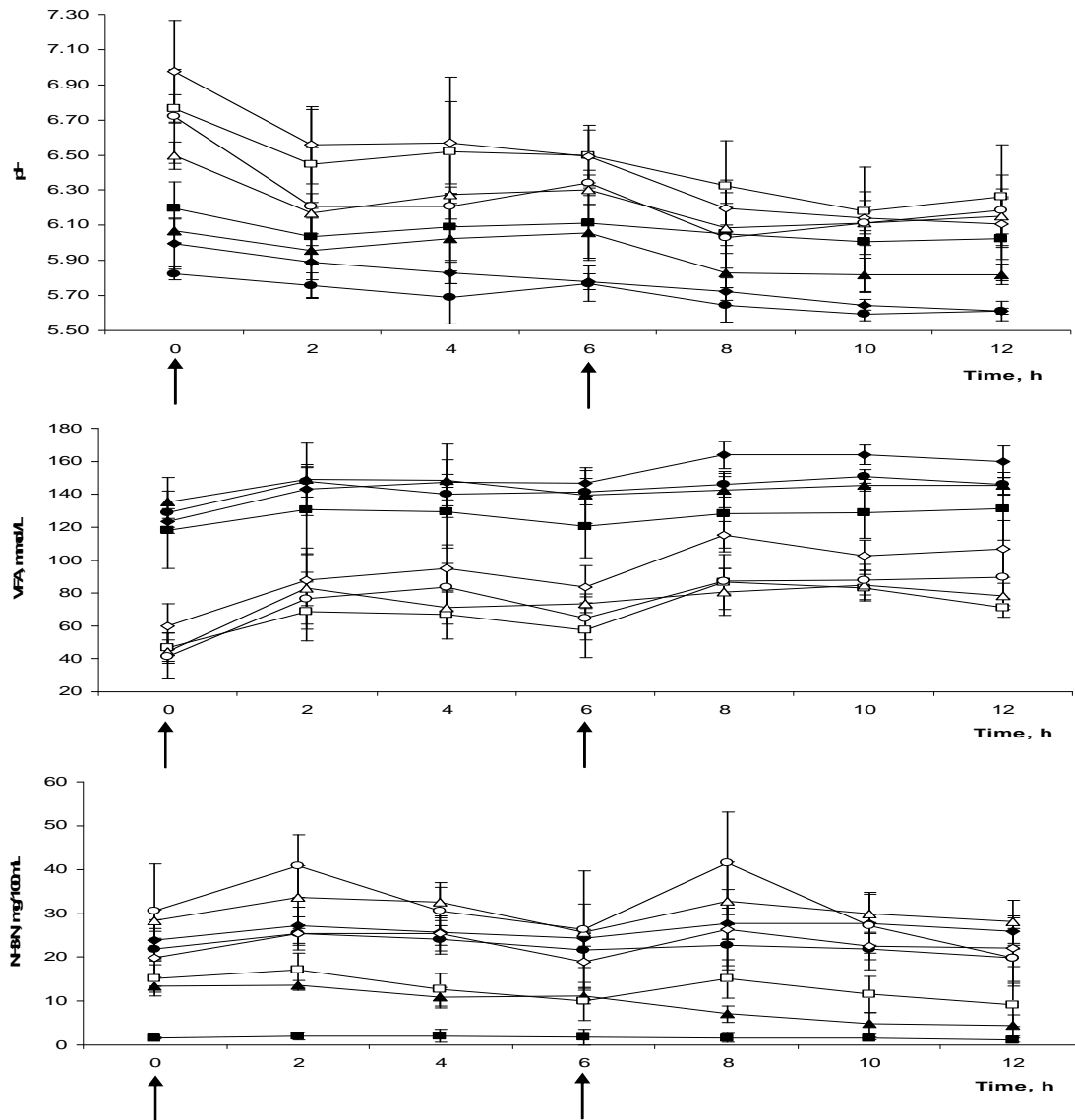
same range of values with both inputs. In addition, values for diet GF were below the minimum required to maximize microbial protein synthesis (3.3 to 8.5 mg/100 mL; Kang-Meznarich and Broderick, 1981), which supports the hypothesis on a bad SFCCF ability to simulate this aspect with low CONC diets, particularly those with low quality forages as observed by Moumen (2003).

Figure 1 shows the postprandial evolution over time of pH, VFA and ammonia-N concentration in both SFCCF fed 45 g DM and in the goat's rumen previously fed the same diets (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009). The interaction of diet x origin x time after feeding was not significant ( $P \geq 0.18$ ) for any of the three studied parameters, indicating that, despite the possible differences in absolute values, there was a similar pattern over time in SFCCF with high input and in the goat's rumen (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009) for the 4 experimental diets. This disagrees with the results found by Carro *et al.* (2009), who reported a different pattern of pH and total VFA concentration in SFCCF vs sheep with similar diets. A similar evolution over time of fermentation parameters in SFCCF with low input was observed except for pH values (diet x origin x time interaction;  $P < 0.001$ ), likely because the "saliva/feed" ratio was higher than in both animals (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009) and SFCCF with high input, and thus buffering the fermentation end-products in a different extent.

### ***Nitrogen metabolism***

The CP degradation (Table 4) was improved as the CONC level increased only for diets based on G (F x F:C interaction;  $P \leq 0.02$ ), affecting in turn the digestible N intake (DNI) and ammonia N concentration in the same way (F x F:C interaction;  $P \leq 0.001$ ). Moreover, as a result of the previously described forage-based response of true OM digestibility to high levels of CONC (F x F:C interaction;  $P \leq 0.06$ ) the true *in vitro* digestible OM intake had a similar response: differences due to the level of CONC in diets based on G but not for those based on A (F x F:C interaction;  $P \leq 0.04$ ). Since ruminal microbial protein synthesis depends mainly on fermentable energy supply and available N (Bach *et al.*, 2005), it is not surprising that the MNF and the microbial synthesis efficiency (**MSE**) showed a similar F x F:C interaction ( $P \leq 0.04$ ). In the previous *in vivo* study with the same diets (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009) the apparent

CP digestibility showed a similar F x F:C interaction which led to a DNI with identical trend.



**Figure 1.** Ruminal pH (A), total VFA (B) and ammonia N concentration (C) with time after feeding in single-flow continuous-culture fermenters and in the rumen of goats (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009) fed the experimental diets. Diets were 70% grass hay and 30% concentrate (GF *in vivo* = □, GF *in vitro* = ■); 70% alfalfa hay and 30% concentrate (AF *in vivo* = ◇, AF *in vitro* = ◆); 30% grass hay and 70% concentrate (GC *in vivo* = △, GF *in vitro* = ▲); 30% alfalfa hay and 70% concentrate (AC *in vivo* = ○, AC *in vitro* = ●). *In vitro* graphs include only values from fermenters with low pH resulting from high intake (45 g DM) of the experimental diets. Diet × Origin × time after feeding interaction values were significant neither for ruminal pH ( $P = 0.19$ ) nor VFA ( $P = 0.71$ ) nor ammonia-N concentration ( $P = 0.18$ ). Arrows show feeding times (↑). Diet × origin × time after feeding comparing goat's rumen vs. fermenters with high pH resulting from low intake (30 g DM) of the experimental diets were significant for pH ( $P < 0.001$ ) but not for VFA ( $P = 0.35$ ) and ammonia-N concentration ( $P = 0.09$ ).

The DNI in that *in vivo* study was considered as the determinant factor provoking an increase of urinary total PD excretion only for diets based on G as

CONC increased. Since the urinary PD excretion, unlike the MNF or the MSE estimated *in vivo* (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009) were affected similarly to the MNF estimated in SFCCF by the studied effects it is possible that the extrapolation made from PD excretion to the *in vivo* MNF, using the PB:N ratio from LAB and SAB values, might be somewhat inaccurate in our conditions. The MNF estimates *in vitro* rely upon the quotient between the PB:N ratio in the effluent and the PB:N ratio in EB, and the potential biases affecting the determination of one of the two PB:N ratios were likely compensated to some extent with biases in the other. This might not occur *in vivo* where the extrapolation from PD excretion into MNF could be highly influenced by potential biases in the determination of PB:N ratios in LAB and SAB. In agreement with Hannah *et al.* (1986), the MSE calculated *in vivo* was higher ( $P < 0.001$ ; data not shown) than that calculated in SFCCF, which, unlike the former, was within the range of those found by others in SFCCF fed similar diets (Meng *et al.*, 1999; Molina-Alcaide *et al.*, 2009) and was very close to the mean value established by the ARC (1984) for sheep fed different diets.

In addition, MSE *in vitro* was similar ( $P < 0.24$ ; data not shown) in SFCCF with both high and low pH, which agreed with results from Calsamiglia *et al.* (2002). These authors reported no changes in the efficiency of microbial protein synthesis (g N/kg OM truly digested) within a pH range between 5.7 and 6.4. In this sense, Hoover and Miller (2002) summarized several studies in which the pH was modified in *in vitro* conditions and observed that the MPS was only affected when the pH decreased below 5.5. In general there seemed to be a good simulation *in vitro* for N metabolism, being even possible to estimate the MNF in a more accurate way than *in vivo* if potential errors in PB determination could be minimized by using the quotient of effluent/bacteria to distinguish the percentage of NNA of microbial origin flowing out of the fermenters.

The composition of LAB and SAB isolated from the content of fermenters fed 45 g DM (Table 5) was compared to that found in the same pellets isolated from the goat's rumen fed the same diets (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009). The OM content was lower ( $P = 0.07$ ) in bacteria isolated from fermenters than isolated from the goat's rumen, in accordance with other studies (Hannah *et al.*, 1986; Molina-Alcaide *et al.*, 2009).

**Table 4 .** Effect of forage (F) and forage:concentrate ratio (F:C) on N metabolism in single-flow continuous-culture fermenters (SFCCF) fed the experimental diets at two different inputs(30 or 45 g DM).

| Items <sup>2</sup>                                       |                               | Diets <sup>1</sup> |                    |                    |                    | SEM   | P-value |         |         |
|--|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|---------|---------|---------|
|  |                               | GF                 | AF                 | GC                 | AC                 |       | F       | F:C     | F × F:C |
| True digestible OM intake, g/d                           | Low input SFCCF <sup>3</sup>  | 14.4 <sup>a</sup>  | 15.4 <sup>b</sup>  | 17.3 <sup>c</sup>  | 17.3 <sup>c</sup>  | 0.12  | 0.06    | < 0.001 | 0.03    |
|  | High input SFCCF <sup>4</sup> | 20.7 <sup>a</sup>  | 21.1 <sup>ab</sup> | 23.0 <sup>b</sup>  | 22.4 <sup>ab</sup> | 0.24  | 0.86    | 0.04    | 0.35    |
| Digestible N intake, g/d                                 | Low input SFCCF               | 0.36 <sup>a</sup>  | 0.73 <sup>c</sup>  | 0.56 <sup>b</sup>  | 0.70 <sup>c</sup>  | 0.011 | < 0.001 | 0.001   | < 0.001 |
|  | High input SFCCF              | 0.47 <sup>a</sup>  | 0.92 <sup>c</sup>  | 0.70 <sup>b</sup>  | 0.82 <sup>c</sup>  | 0.014 | < 0.001 | 0.02    | < 0.001 |
| NH <sub>3</sub> -N, mg/100 mL                            | Low input SFCCF               | 1.36 <sup>a</sup>  | 26.0 <sup>c</sup>  | 11.6 <sup>b</sup>  | 22.6 <sup>c</sup>  | 0.53  | < 0.001 | 0.02    | < 0.001 |
|  | High input SFCCF              | 1.94 <sup>a</sup>  | 26.2 <sup>d</sup>  | 7.10 <sup>b</sup>  | 22.4 <sup>c</sup>  | 0.27  | < 0.001 | 0.17    | < 0.001 |
| Microbial N flow, mg/d                                   | Low input SFCCF               | 336 <sup>a</sup>   | 452 <sup>b</sup>   | 493 <sup>b</sup>   | 506 <sup>b</sup>   | 8.5   | 0.003   | < 0.001 | 0.01    |
|  | High input SFCCF              | 463 <sup>a</sup>   | 570 <sup>b</sup>   | 658 <sup>b</sup>   | 609 <sup>b</sup>   | 11    | 0.21    | < 0.001 | 0.003   |
| CP degradation, %  | Low input SFCCF               | 58.7 <sup>a</sup>  | 78.0 <sup>b</sup>  | 69.3 <sup>b</sup>  | 74.3 <sup>b</sup>  | 1.2   | < 0.001 | 0.18    | 0.01    |
|  | High input SFCCF              | 52.0 <sup>a</sup>  | 65.8 <sup>b</sup>  | 57.8 <sup>ab</sup> | 59.6 <sup>ab</sup> | 1.1   | 0.003   | 0.91    | 0.02    |
| Microbial synthesis efficiency , g N/kg dOM <sup>5</sup> | Low input SFCCF               | 23.4 <sup>a</sup>  | 29.4 <sup>b</sup>  | 28.5 <sup>b</sup>  | 29.3 <sup>b</sup>  | 0.53  | 0.008   | 0.04    | 0.03    |
|  | High input SFCCF              | 22.4 <sup>a</sup>  | 27.0 <sup>b</sup>  | 28.6 <sup>b</sup>  | 27.2 <sup>b</sup>  | 0.41  | 0.08    | 0.002   | 0.003   |

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

<sup>1</sup> GF = 70% grass hay and 30% concentrate, DM basis; GC = 30% grass hay and 70% concentrate, DM basis; AF = 70% alfalfa hay and 30% concentrate, DM basis; AC = 30% alfalfa hay and 70% concentrate, DM basis

<sup>2</sup> Observations, n = 4; except for N-NH<sub>3</sub> concentration (n = 28)

<sup>3</sup> Single-flow continuous-culture fermenters with high pH resulting from low input (30 g DM) of the experimental diets

<sup>4</sup> Single-flow continuous-culture fermenters with low pH resulting from high input (45 g DM) of the experimental diets

<sup>5</sup> tdOM = true digestible OM, calculated as true OM digestibility (%) x OM intake

Total N and adenine content were not affected ( $P \geq 0.46$ ) by either the origin or the pellet. In contrast, guanine content was affected by both the pellet ( $P = 0.02$ ) and the origin ( $P = 0.008$ ) and, as a consequence, the total PB content and the PB:N ratio were also affected by the same effects ( $P \leq 0.03$ ). This was likely to be caused by the lower ( $P < 0.05$ ) values found for SAB compared to LAB only in SFCCF, which was also previously reported in CCF (Rodríguez-Prado *et al.*, 2004). Since changes in PB concentration have been associated with the presence of different bacterial species with different growth rates (Obispo and Dehority, 1999), the lower content of PB in SAB isolated from fermenters might be due to the lower growth rate of the microbial population in this pellet compared to those from the rumen.

Our results indicate that single-flow continuous-culture fermenters are an adequate tool to reproduce the effect of changing the F:C ratio from 70:30 to 30:70 on most of the previously *in vivo* measured parameters (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009) and to simulate the evolution of the studied fermentation parameters over time. In contrast, the effect of the forage type in the diet was, in some cases badly simulated, since fermenters fed low concentrate diets were likely highly influenced by the quality of the forage.

This suggests that the higher the quality of diets used in single-flow continuous-culture fermenters, the better the simulation is. Fermenters fed 45 g DM (average pH ranging from 5.70 to 6.08) failed to reproduce the studied effects on some parameters found *in vivo* (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009) in comparison to those fed 30 g DM (average pH ranging from 6.22 to 6.53). This underlines the importance of pH for these *in vitro* experiments. In addition, the single-flow continuous culture fermenters were able to maintain a similar composition of LAB compared to that found *in vivo* but not that of SAB.

**Table 5.** Composition of liquid (LAB) and solid (SAB) associated bacteria isolated from the rumen of goats and from single-flow continuous-culture fermenters (SFCCF) fed 45 g DM of the experimental diets<sup>1</sup>.

| Items <sup>2</sup>                     | LAB                |                   | SAB                |                    | SEM   | P-value |        |                 |
|--|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------|---------|--------|-----------------|
|  | Rumen              | SFCCF             | Rumen              | SFCCF              |       | Pellet  | Origin | Pellet x Origin |
| DM, g/100 g fresh matter               | 88.7 <sup>b</sup>  | 85.0 <sup>a</sup> | 87.5 <sup>ab</sup> | 86.9 <sup>ab</sup> | 0.39  | 0.68    | 0.01   | 0.06            |
| OM, g/100 g DM                         | 89.0 <sup>ab</sup> | 87.1 <sup>a</sup> | 90.6 <sup>b</sup>  | 88.4 <sup>ab</sup> | 0.34  | 0.07    | 0.007  | 0.83            |
| Total N, mg/g DM                       | 78.5 <sup>ab</sup> | 82.1 <sup>b</sup> | 80.7 <sup>b</sup>  | 74.8 <sup>ab</sup> | 1.33  | 0.39    | 0.71   | 0.11            |
| Purine bases, $\mu\text{mol/g DM}$     |                    |                   |                    |                    |       |         |        |                 |
| Adenine                                | 34.3               | 35.4              | 36.0               | 30.1               | 1.42  | 0.58    | 0.46   | 0.26            |
| Guanine                                | 48.0 <sup>b</sup>  | 41.5 <sup>b</sup> | 42.4 <sup>b</sup>  | 24.7 <sup>a</sup>  | 2.07  | 0.02    | 0.008  | 0.21            |
| Total                                  | 82.3 <sup>b</sup>  | 76.9 <sup>b</sup> | 78.4 <sup>b</sup>  | 54.8 <sup>a</sup>  | 2.68  | 0.03    | 0.01   | 0.12            |
| Purine bases:N, $\mu\text{mol/mg N}^3$ | 1.03 <sup>b</sup>  | 0.94 <sup>b</sup> | 0.95 <sup>b</sup>  | 0.74 <sup>a</sup>  | 0.027 | 0.02    | 0.009  | 0.28            |

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

<sup>1</sup> GF = 70% grass hay and 30% concentrate, DM basis; GC = 30% grass hay and 70% concentrate, DM basis; AF = 70% alfalfa hay and 30% concentrate, DM basis; AC = 30% alfalfa hay and 70% concentrate, DM basis

<sup>2</sup> Observations, n = 16

<sup>3</sup> Average rumen bacterial purine bases:N ratio have been calculated from previously published data (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009).



### LITERATURE CITED

- AOAC. 2005. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC. 18th Ed. AOAC, Arlington, VA.
- ARC. 1984. The Nutrient Requirement of Ruminant Livestock (No.1). Commonwealth Agriculture Bureaux, Slough, UK.
- Bach, A., S. Calsamiglia, and M. D. Stern. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 88:E9–E21.
- Balcells, J., J. A Guada, J. M. Peiró, and D. S. Parker. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 575:153–157.
- Cantalapiedra-Híjar. G., E. Molina-Alcaide, and D. R. Yáñez-Ruíz. 2007. Bacterial diversity in goats rumen and in single-flow continuous culture fermenters analysed by DGGE. In: *Avances Metodológicos en el Estudio de la Microbiología Digestiva*. 10-11. University of Zaragoza. Spain.
- Cantalapiedra-Híjar, G., D. R. Yáñez-Ruíz, A. I. Martín-García, and E. Molina-Alcaide. 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., 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.
- Calsamiglia, S., A. Ferret, and M. Devant. 2002. Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 85:3574-3579.
- Calsamiglia, S., P. W. Cardozo, A. Ferret, and A. Bach. 2008. Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *J. Anim. Sci.* 86:702-711.
- Castillejos, L., S. Calsamiglia, A. Ferret, and R. Losa. 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.

- Cerrillo, M. A., J. R. Russell, and M. H. Crump. 1999. The effects of hay maturity and forage to concentrate ratio on digestion kinetics in goats. *Small Rum. Res.* 32:51–60.
- Cheng, K. J., J. Fay, and R. Howarth. 1980. Sequence of events in the digestion of fresh legume leaves by rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:613-619.
- Church, D. C. 1976. Digestive physiology and nutrition of ruminants. Vol. I. Digestive physiology. D. C. Church, Corvallis, OR.
- Crawford, 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. Bredenknecht. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 38:371-384.
- Dahlberg, E. M., and F. R. Ehle. 1988. Effects of forage source on ruminal microbial nitrogen metabolism and carbohydrate digestion in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 66:2071-2083.
- Devant, M., A. Ferret, S. Calsamiglia, R. Casals, and J. Gasa. 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.
- Fimbres, H., J. R. Kawas, G. Hernández-Vidal, J. F. Picón-Rubio, and C. D. Lu. 2002. Nutrient intake, digestibility, mastication and ruminal fermentation of lambs fed finishing ration with various forage levels. *Small Rum. Res.* 43:275–281.
- Griswold, K. E., G. A. Apgar, J. Bouton, and J. L. Firkins. 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.
- Hannah, S. M., M. D. Stern, and F. R. Ehle. 1986. Evaluation of a dual flow continuous culture system for estimating bacterial fermentation *in vivo* of mixed diets containing various soya bean products. *Anim. Feed Sci. Technol.* 16:51-62.

- Hoover, W. H., and T. K. Miller. 1992. Rumen digestive physiology and microbial ecology. Bull. 708T, Agric. Forestry Exp. Sta., West Virginia University, Morgantown, WV.
- Isac, M. D., M. A. García, J. F. Aguilera, and E. Molina-Alcaide. 1994. A comparative study of nutrient digestibility, kinetics of digestion and passage and rumen fermentation pattern in goats and sheep offered medium quality forages at the maintenance level of feeding. Arch. Tierernar. 46:37–50.
- Kang-Meznarich, J. H., and G. A. Broderick. 1981. Effects of incremental urea supplementation on ruminal ammonia concentration and bacterial protein formation J. Anim. Sci. 51:422–431.
- Littell, R. C., P. R. Henry, and C. B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. J. Anim. Sci. 76:1216–1231.
- Mansfield, H. R., M. I. Erdres, 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.
- 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.
- McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochem. J. 43:99-109.
- Meng, Q., M. S. Kerley, P. A. Ludden, and R. L. Relyea. 1999. Fermentation substrate and dilution rate interact to affect microbial growth and efficiency. J. Anim. Sci. 77:206-214.
- Miettinen, H., and J. Setälä. 1989. Design and development of a continuous culture system to study rumen fermentation. J. Agric. Sci. Finland. 61:463–473.
- Molina-Alcaide, E., M. R. Weisbjerg, and T. Hvelplund. 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., M. R. Pascual, G. Cantalapiedra-Hijar, E. Y. Morales-García, and A. I. Martín-García. 2009. Effects of concentrate replacement by feed blocks on ruminal fermentation and microbial growth in goats and single-flow continuous-culture fermenters. DOI:10.2527/jas.2008-1263.
- 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. PhD Diss. University of Granada. Spain.
- Muetzel, S., Lawrence P., Hoffmann E. M., and K. Becker. 2009. Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. Anim. Feed Sci. Technol. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2008.11.001.
- Obispo, N. E., and B. A. Dehority. 1999. Feasibility of using total purines as a marker for ruminal bacteria. J. Anim. Sci. 77:3084-3095.
- Pitt, R. E., J. S. Van Kessel, D. G. Fox, A. N. Pell, M. C. Barry, and P. J. Van Soest. 1996. Prediction of ruminal volatile fatty acids and pH within the net carbohydrate and protein system. J. Anim. Sci. 74:226-244.
- Ramanzin, M., L. Bailoni, and S. Schiavon. 1997. Effect of forage to concentrate ratio on comparative digestion in sheep, goats and fallow deer. Anim. Sci. 64:163–170.
- Rodríguez-Prado, M., S. Calsamiglia, and A. Ferret. 2004. Effects of fiber content and particle size of forage on the flow of microbial amino acids from continuous culture fermenters. J. Dairy Sci. 87:1413–1424.
- Rotger, A., A. Ferret, S. Calsamiglia, and X. Manteca. 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 diets. J. Anim. Sci. 84:1188–1196.
- Russell, J. B., and D. B. Dombrowski. 1980. Effect of PH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. Appl. Environ. Microbiol. 39:604-610.
- Soto, E. C., D. R. Yáñez-Ruíz, G. Cantalapiedra-Hijar, A. Vivas, A. I. Martín-García and E. Molina Alcaide. 2008. Evolution of microbial communities in the rumen of goats and in single-flow continuous culture fermenters during adaptation to diet. Proceedings of the 6th INRA-RRI Symposium: Gut microbiome, 27, Clermont-Ferrand, France.

- Slyter, L. L., and T. S. Rumsey. 1991. Effect of coliform bacteria, feed deprivation, and pH on ruminal D-lactic acid production by steer or continuous-culture microbial populations changed from forage to concentrates. *J. Anim. Sci.* 69:3055-3066.
- Stokes, S. R., W. H. Hoover, T. K. Miller, and R. P. 1991. Impact of carbohydrate and protein level on bacterial metabolism in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 74:860-870.
- Tilley, J. M. A., and R. A. Terry. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18:104–111.
- 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.
- de Veth, M. J., and E. S. Kolver. 2001. Diurnal variation in pH reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 84:2066-2072.
- Wales, W. J., E. S. Kolver, P. L. Thorne, and A. R. Egan. 2004. Diurnal variation in ruminal pH on the digestibility of highly digestible perennial ryegrass during continuous culture fermentation. *J. Dairy Sci.* 87:1864-1871.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analyt. Chem.* 39:971–974.

## **PUBLICACIÓN 4**

### **Experimento 2**

**(Publicado en Avances Metodológicos en el Estudio de la Microbiología Digestiva. 2009. pp: 10-11)**

Diversidad bacteriana en el rumen de cabras y en fermentadores de flujo continuo analizada mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

**Bacterial diversity in the rumen and continuous fermenters study by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)**



**Diversidad bacteriana en el rumen de cabras y fermentadores de flujo simple continuo analizada mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)**

G. Cantalapedra-Hijar, E. Molina-Alcaide, D.R. Yáñez-Ruiz

**RESUMEN**

Se realizó un ensayo con cuatro cabras canuladas en rumen y ocho fermentadores de flujo simple continuo. El objetivo fue comparar la diversidad bacteriana en ambos sistemas cuando se suministraban 4 dietas constituidas por heno de gramínea o de alfalfa y concentrado en las proporciones 70:30 y 30:70. Tras la adaptación de los animales y fermentadores a la dieta se tomaron muestras del contenido ruminal y del fermentador para el estudio de las poblaciones bacterianas, mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante. El índice Shannon de diversidad bacteriana fue menor en fermentadores que en el rumen de caprino cuando se alimentaban con las dietas que contenían heno de gramíneas (3,94 y 3,89, respectivamente) y similar para las dietas a base de heno de alfalfa (3,89 y 3,90, respectivamente). Los dendrogramas de similitud mostraron que las muestras *in vivo* e *in vitro* se agruparon por separado y que, dentro de estos grupos, hubo un agrupamiento por dieta. La similitud fue superior en las muestras del rumen que en las de fermentadores. Los resultados no indican una reducción de la diversidad bacteriana en fermentadores de flujo simple continuo en comparación con el rumen de caprino, aunque sí diferencias en algunas poblaciones bacterianas.

Palabras clave: Fermentadores de flujo simple continuo, rumen, caprino, diversidad bacteriana.

**SUMMARY**

A trial with four cannulated goats and eight single flow continuous fermenters was carried out. The aim was to compare the bacterial diversity in the rumen and fermenters fed 4 diets composed by grass or alfalfa hay and a concentrate in 70:30 and 30:70 ratios. After the adaptation of animals and fermenters to diets, samples from rumen and fermenters content were collected



to study the bacterial communities by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. The bacterial diversity Shannon index was lower in fermenters than in goats rumen fed diets containing grass hay (3.94 and 3.89, respectively) and similar for diets containing alfalfa hay (3.89 and 3.90, respectively). Dendrograms of similarity showed that samples from *in vivo* and *in vitro* trials were plot separately and that, within groups they were plotting by diet. The similarity was higher in rumen samples than in samples from fermenters. Results do not indicate a decrease of bacterial diversity in single-flow continuous culture fermenters compared with the rumen of goat, although there are differences in some bacterial populations.

Key words: Single-flow continuous culture fermenters, rumen, goat, bacterial diversity.

## INTRODUCCIÓN

El uso de sistemas *in vitro* que simulan la actividad fermentativa del rumen se ha extendido entre los nutricionistas durante las últimas décadas (Molina-Alcaide *et al.*, 1996; Carro y Miller, 1999; Calsamiglia *et al.*, 2002). Su utilización palia el uso de animales fistulados en rumen e intestino delgado y, en consecuencia, tiene en cuenta aspectos ético-legales y la protección de los animales destinados a experimentación. Adicionalmente, el uso de sistemas de simulación contribuye a disminuir los costes, la mano de obra, el tiempo requerido para el desarrollo de los ensayos *in vivo* y la variabilidad individual de las unidades experimentales. Sin embargo, el uso de sistemas de simulación está supeditado a su validación, mediante estudios comparativos *in vivo* e *in vitro*. Los estudios comparativos realizados hasta el momento son escasos y se han centrado exclusivamente en ganado vacuno (Mansfield *et al.* 1995; Merry *et al.*, 2006). Por otro lado, no se han estudiado las poblaciones microbianas que predominan en cada sistema, que en último término, son las responsables de los parámetros que se analizan y comparan. El objetivo del presente trabajo es comparar la diversidad bacteriana en el rumen de cabras de raza granadina y en fermentadores de flujo simple continuo, cuando se suministran dietas de distinta calidad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

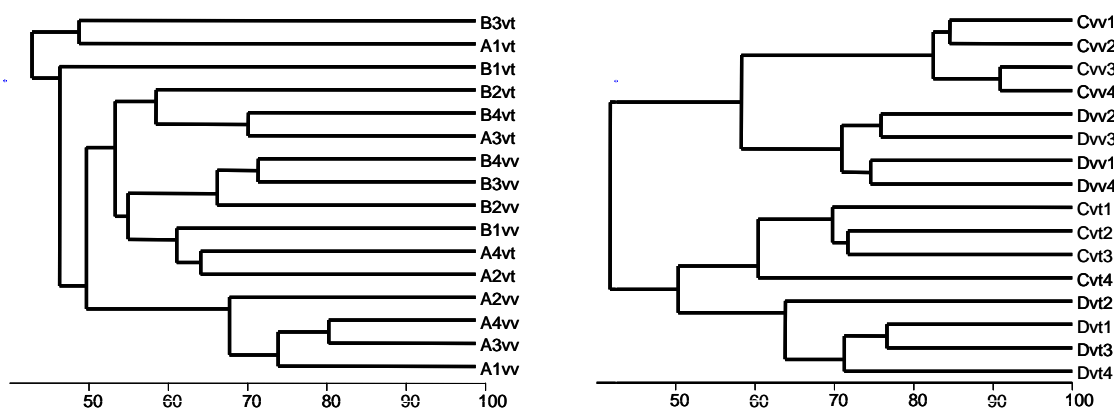
Se realizó un ensayo *in vivo*, siguiendo un diseño en cuadrado latino 4 x 4, con cuatro cabras de raza granadina ( $45 \pm 2,4$  kg PV) dotadas de cánula ruminal permanente y alojadas individualmente en jaulas metabólicas. En cada uno de los periodos experimentales cada animal recibía una de las 4 dietas experimentales, elaboradas con heno de hierba o de alfalfa y un concentrado comercial. El forraje representaba el 70% (dietas A y C, respectivamente para el heno de hierbas y de alfalfa) o el 30% (dietas B y D, respectivamente para el heno de hierbas y de alfalfa). Cada ensayo incluía un período de adaptación a la dieta de 10 días de duración y 1 día de muestreo del contenido ruminal. El último día de cada ensayo se extrajo líquido ruminal de cada animal para inocular el fermentador correspondiente. En los ensayos *in vitro* se han utilizado 4 fermentadores de flujo continuo simple (Miettinen y Setälä, 1989). Cada ensayo tuvo una duración de 7 días con 6 días de adaptación a las dietas y 1 día para la recogida de muestras. Las dietas se suministraron en dos tomas iguales a las 8:00 y 14:00 h tanto en los ensayos *in vivo* como en los *in vitro*. En el día de recogida se tomaron muestras del contenido ruminal y del vaso del fermentador en tubos falcon estériles de 20 ml y en tubos estériles eppendorf de 2 ml, respectivamente, dos horas después de la administración del alimento. Una vez obtenida la muestra, se congeló y liofilizó. La extracción del ADN de las muestras se realizó utilizando el kit QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit (Qiagen Ltd, Carwley, West Sussex, UK). Tras la extracción, un fragmento de 200 pares de bases del ADN ribosómico de la fracción 16S fue amplificado mediante PCR, empleándose oligonucleótidos específicos y universales para bacterias (Nubel *et al.*, 1996), adaptados para DGGE, y el programa de ciclos: 94°C 4 min; 94 °C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min (25 ciclos); 94°C 1 min, 55 1 min, 72 10 min. La electroforesis de gradiente desnaturizante (DGGE) se llevó a cabo en gel de polyacrilamida (8 %), con un gradiente de urea/formamida del 50 al 65 % durante 16 horas en las siguientes condiciones: 130V, 200 mA y 250 W. Las muestras se repartieron en dos geles según el tipo de forraje empleado, con objeto de comparar las condiciones *in vivo-in vitro* y la proporción de forraje en la dieta: gel 1 para las dietas A y B y gel 2 para las dietas C y D. La tinción del gel se realizó utilizando el kit de plata de Amersham Biosciences (Suecia) y, tras ser escaneado, se analizó el patrón de bandas mediante el programa

Quantity One® (BioRad, EEUU). Tras la obtención de la matriz de similitud el análisis filogenético del patrón de bandas se realizó empleando el programa NEIGHBOUR (Phylogeny Inference Package, EEUU) y el método de agrupamiento UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages). El índice de biodiversidad Shannon fue calculado de acuerdo con la metodología propuesta por Marrugan (1988).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los dos geles mostraron un número total de bandas muy similar (72 y 75, respectivamente para los geles 1 y 2). La diversidad bacteriana, cuantificada mediante el índice Shannon, fue menor en las muestras de los fermentadores que en las del rumen de caprino en el gel 1 (3,94 y 3,89, respectivamente) y similar en el gel 2 (3,89 y 3,90, respectivamente).

El análisis de los geles mediante dendrograma (Figura 1) reflejó una similitud muy baja entre todas las muestras, inferior al 50 %, y agrupó las muestras procedentes de los ensayos *in vivo* e *in vitro* de forma separada, siendo esto más claro en el gel correspondiente a las dietas C y D que en el de las dietas A y B.



**Figure 1.** Dendrograms corresponding to the pattern of DGGE bands for gels 1 (diets A and B) and 2 (diets C and D), respectively; vv: *in vivo*; vt: *in vitro*. The scale of bars shows the percentage of similarity

Este patrón de agrupamiento predominó frente al del tipo de dieta, aunque dentro de los grupos de muestras *in vivo* e *in vitro* se observó un agrupamiento en función de relación forraje:concentrado de la dieta. La

uniformidad, medida como el porcentaje de similitud en cada grupo del dendrograma, fue superior en las muestras procedentes de los ensayos *in vivo* que en las obtenidas en los fermentadores. Los resultados obtenidos indican que no existe una reducción importante de la diversidad bacteriana en fermentadores de flujo continuo simple inoculados con líquido ruminal de caprino, en comparación con el rumen de caprino. Sin embargo, existen diferencias en algunas poblaciones bacterianas, probablemente como consecuencia de la adaptación a las condiciones *in vitro*.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Carro MD, Miller EL, 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. 82:149-57.
- Calsamiglia S, Ferret A, Devant M, 2002. Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual –flow continuous culture system. J. Dairy Sci. 85:574-9.
- Molina-Alcaide E, Weisbjerg MR, 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
- Mansfield HR, Endres MI, Stern MD, 1995. Comparison of microbial fermentation in the rumen of dairy cows and dual flow continuous culture. Anim. Feed Sci. Technol. 55: 47-66.
- Marrugan A, 1988. Ecological diversity and its measurement. London: Chapman and Hall.
- Merry RJ, Lee MR, Davies DR, Dewhurst RJ, Moorby JM, Scollan ND, Theodorou MK, 2006. Effects of high-sugar ryegrass silage and mixtures with red clover silage on ruminant digestion. 1. *In vitro* and *in vivo* studies of nitrogen utilization. J. Anim. Sci. 84: 3049-60.
- Nübel U, Engelen B, Felske A, Snaidr J, Wieshuber A, Amann RI, Ludwig W, Backhaus H, 1996. Sequences heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. J. Bacteriol. 178:5636-43.



**PUBLICACIÓN 5**

**Experimento 2**

**(Environmental Microbiology. Enviado)**

¿Pueden los fermentadores de flujo simple continuo mantener una comunidad bacteriana de estructura y tamaño similar a la establecida en el rumen de cabras?

**Can rumen-simulating continuous-culture fermenters sustain a similar bacterial community structure and size to that established in the goats rumen?**



**Can rumen-simulating continuous-culture fermenters sustain a similar bacterial community structure and size to that established in the goats rumen?**

Cantalapiedra-Hijar G, Yáñez-Ruiz DR, Newbold CJ, Molina-Alcaide E

**Summary**

The aim of this work was to compare the structure and size of bacterial community in goats rumen and in rumen-simulating continuous-culture fermenters (CCF). The Shannon diversity index elicited by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis and total bacteria concentration obtained by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) showed that bacterial community from most of the CCF content samples was as diverse and numerous as that in the rumen of goats. However the bacterial structure was quite different in the rumen and CCF when clustering and principal components analysis (PCA) was carried out from the pattern of peaks obtained by T-RFLP. Moreover, the results of this work revealed that the relative phylogenetic assignments of the microbial community in the rumen and fermenters content samples differed ( $P < 0.05$ ) at the Clostridia, Beta and Gamma proteobacteria class level. Similar diversity and total bacteria numbers in CCF compared to the rumen, along with the partial ability of fermenters to discriminate the bacteria pellets according to the diet received similarly to what occurs *in vivo* as shown by a discriminant analysis, may indicate that *in vitro* technologies like CCF have some potential from an ecological point of view as experimental rumen models.

**Introduction**

Ruminants have a valuable role in sustainable agricultural systems (Oltjen and Beckett, 1996) and they are particularly useful in converting vast renewable resources from rangeland, pastures, and crop residues or other by-products into high quality food. The complex symbiotic microbiota of the rumen is responsible for breakdown of plant fiber, an ability the host animal lacks. Among the different microbes inhabiting the ruminant's forestomach, bacteria are the most



diverse and quantitatively important group and play an important role in animal health and nutrition (Sadet *et al.*, 2007). The complex ruminant's digestion requires a greater variety and complexity of experimental methods for research than with any other animal species. The fact that dietary ingredients are first subjected to microbial fermentation into the rumen requires elaborate measures to ascertain nutrients available for absorption and, as a consequence, for products such as meat and milk. Numerous approaches have been attempted to obtain representative samples of digesta at sites throughout the gastrointestinal tract such as cannulas that have been used for many years (Harmon and Richards, 1997).

Nevertheless, there is an increasing awareness of and concern for animal welfare in the public arena. Recently the European Commission (2008) adopted a proposal to revise Directive 86/609/EEC concerning the use of animals for experimentation. The Commission aimed to find alternatives in animal research in order to reduce the number of animals used for scientific procedures following the moral basis of the three Rs principle (Russell and Burch, 1959) of replacement, reduction and refinement of animal use. The most pragmatic approach to reducing experiments with animals is based on the use of *in vitro* simulation techniques. *In vitro* methodologies applied to ruminants nutrition research are used to simulate as closely as possible the *in vivo* gut environment avoiding the use of invasive surgical procedures with the associated ethical implications as well as the high cost and animal variability related to *in vivo* experimentation (Mansfield *et al.*, 1995). Moreover, *in vitro* experiments may provide the advantage of a controlled and well-defined environment that allows focus on specific factors affecting fermentation such as additives (Busquet *et al.*, 2005), by-products (Molina Alcaide *et al.*, 2009), contamination (Strobel *et al.*, 2008), ruminal biohydrogenation of unsaturated fatty acids (Loor *et al.*, 2003) that play an essential role on animal products quality and, as a consequence, on consumers health (Garcia-Lopez *et al.*, 1996). To be an adequate experimental tool, a simulation methodology should mimic the rumen in a number of ways including physical environment and, above all, the maintenance of ruminal microbial communities in diversity and concentrations (Warner, 1956). Despite an increased interest on *in vitro* studies direct comparisons between *in vivo* and *in vitro* rumen fermentations are limited

(Hannah *et al.* 1989; Mansfield *et al.* 1995; Muetzel *et al.*, 2008; Molina-Alcaide *et al.*, 2009) and few studies have focused on the ability of *in vitro* systems to maintain a representative ruminal microbial population (Slyter and Putnam, 1967; Ziemer *et al.*, 2000; Muetzel *et al.*, 2009) as part of the model system validation. Significant disagreement between *in vivo* and *in vitro* results has been reported (Gomez *et al.*, 2005; Rotger *et al.*, 2006; Carro *et al.*, 2008; mira a ver si sirve tambien nuestra cita Molina-Alcaide *et al.*, 2009). We hypothesize that a great part of the disagreement between *in vivo* and *in vitro* results is due to the different microbial communities which are established in the rumen and in fermenters. Because of the limitations of culture-based techniques (Amann *et al.*, 1995) molecular methods have been developed to better characterize the microbial populations in the rumen. Recently Strobel *et al.* (2008) stated the suitability of a semi-continuous culture fermenter to evaluate the effect of a mycotoxin contaminating feeds on the structural diversity of rumen microorganisms and to identify which feed properties were most determinant. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP; Liu *et al.*, 1997) is one of the most frequently used high throughput fingerprinting methods to study microbial communities. This method has been shown to be a specific, reliable, and reproducible tool (Dunbar *et al.*, 2001; Osborn *et al.*, 2000) but although becoming an established method in microbiology studies, it is not commonly used to profile microbial communities in the rumen.

The estimation of the microbial protein production in the rumen, the most important parameter for determining animal productivity and animal products quality, is based on the use of both microbial markers such as purine bases, <sup>15</sup>N and diaminopimelic acid (Perez *et al.*, 1996; Molina-Alcaide *et al.*, 2008) and a representative sample of rumen bacteria. Controversial exists (Rodriguez *et al.*, 2000; Carro and Miller, 2002) on the suitability of liquid- (LAB) and solid-(SAB) associated bacteria or even of bacteria isolated from fermenters effluent (EB) to represent the total bacterial biomass in the rumen. It is known that ruminal bacterial pellets differ in composition (Cecava *et al.*, 1990; Molina-Alcaide *et al.*, 1996; Rodríguez-Prado *et al.*, 2004; Molina-Alcaide *et al.*, 2009) but their ability to represent the original bacterial population in the rumen or fermenters has not been studied yet. The objectives of the present work were to evaluate, by using

molecular approaches, both the ability of single-flow continuous-culture fermenters to maintain similar bacterial biomass and communities' structure than those established in the rumen of goats with diets differing in composition and used in practical ruminants production systems and, to study the diversity in different ruminal bacterial pellets (LAB, SAB and EB) compared to that in the whole bacterial population in the rumen and fermenters contents.

## Results

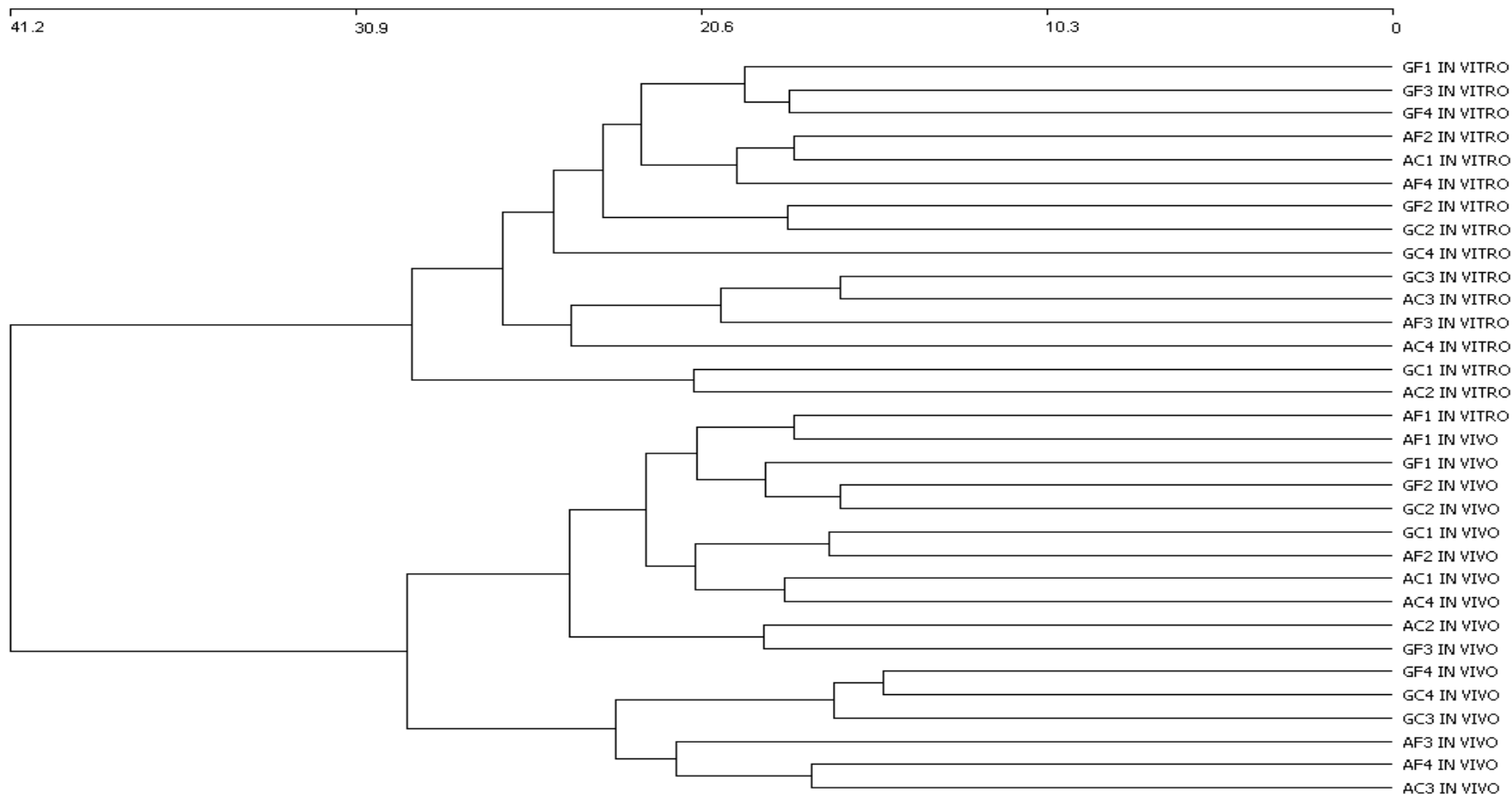
The experimental diets were formulated with forage and concentrate. Two different forages were used: alfalfa hay (A) and grass hay (G). The composition and *in vitro* digestibility of diet ingredients are shown in Table 1.

**Table 1. Chemical composition (g/kg dry matter) and *in vitro* digestibility (g/g) of diet ingredients**

| Item   | Grass hay | Alfalfa hay | Concentrate |
|--|-----------|-------------|-------------|
| Dry matter, g/kg fresh matter                | 904       | 895         | 899         |
| Organic matter                               | 933       | 893         | 905         |
| Crude proteina                               | 94.7      | 192         | 199         |
| Ether extract                                | 16.1      | 14.9        | 33.1        |
| Neutral detergent fibre                      | 506       | 428         | 329         |
| Acid detergent fibre                         | 273       | 320         | 131         |
| Acid detergent lignine                       | 39.2      | 73.0        | 27.0        |
| Gross energy, MJ/kg DM                       | 18.7      | 18.3        | 18.2        |
| <i>In vitro</i> dry matter digestibility     | 0.60      | 0.66        | 0.78        |
| <i>In vitro</i> organic matter digestibility | 0.60      | 0.65        | 0.78        |
| <i>In vitro</i> crude protein digestibility  | 0.68      | 0.79        | 0.82        |

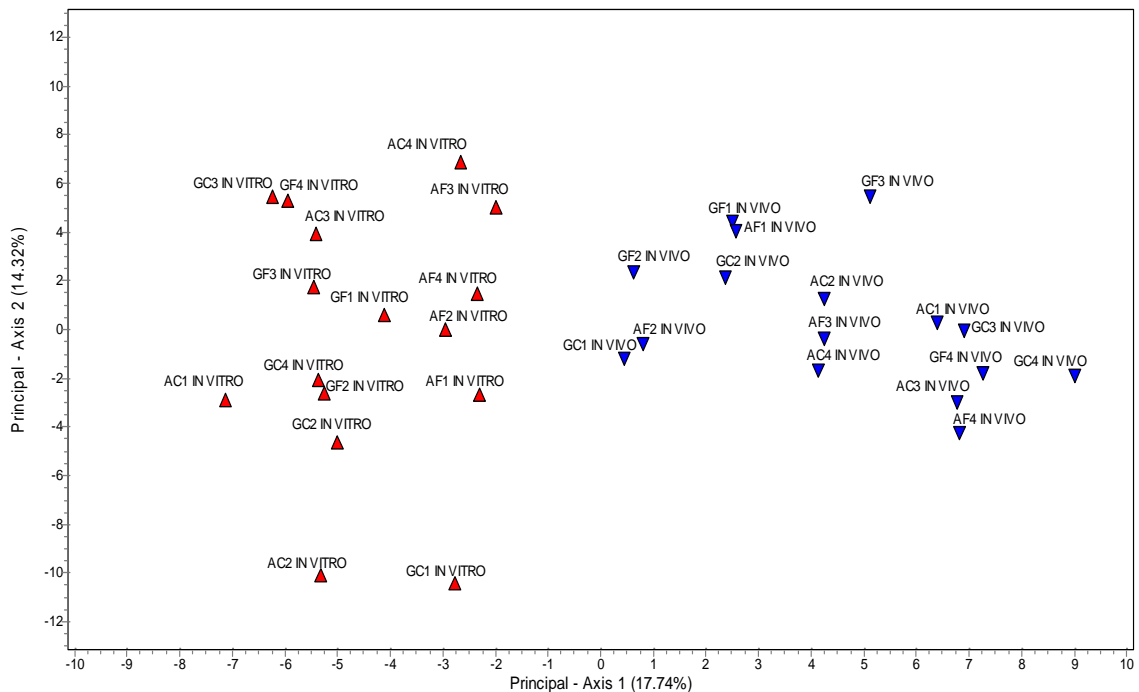
## Rumen vs. Fermenters content

Figure 1 shows a dendrogram based on Hellinger distances from T-RFLP profiles and Ward's method analysis. The dendrogram shows 2 well defined clusters in which samples from rumen contents are separated from those from fermenter contents. Apart from these 2 clusters there is no evidence of any grouping by other studied treatments. The similarity percentage (SIMPER) for rumen content samples (42.8%) was higher than that for fermenter content samples (35.0%).



**Figure 1.** Dendrogram illustrating the relationship between bacterial community, elucidated by T-RFLP, from goat rumen content (*IN VIVO*) and single-flow continuous culture fermenters content (*IN VITRO*) fed 4 different diets. Scaled bars above figure indicate Hellinger Distances. Percentages of similarity (SIMPER) are 35.0%, 42.8% and 32.7% for fermenter, rumen, and all samples, respectively. GF = grass hay low concentrate; GC = grass hay high concentrate; AF = alfalfa hay low concentrate; AC = alfalfa hay high concentrate.

The principal components analysis (PCA) in figure 2 shows that samples taken from the rumen tend to occupy a different position within the graph than samples from fermenters as indicated by the dendrogram as well. Data generated from multiple enzymatic digestions allowed the prediction of bacterial distribution in different phyla and even in the most important classes. Differences between *in vivo* and *in vitro* samples according to the relative number of phylogenetic assignments for Firmicutes and Proteobacteria phyla are shown in Figure 3, being greater and lower ( $P < 0.05$ ), respectively, in samples from fermenters than in those from the rumen (Table 2).



**Figure 2.** PCA covariance plot showing the effect of the system (*IN VIVO* vs. *IN VITRO*) fed 4 different diets. GF = grass hay low concentrate; GC = grass hay high concentrate; AF = alfalfa hay low concentrate; AC = alfalfa hay high concentrate

Relative number of assignments for the rest of main phyla was similar in the rumen and fermenters ( $P > 0.05$ ). The analysis of class distribution within Firmicutes and Proteobacteria phyla revealed that Clostridia represented a greater ( $P = 0.005$ ) percentage of the total assignments *in vitro* than *in vivo* which was reflected in a higher relative number of assignments for Firmicutes in

fermenters (38.4%) than in rumen (33.5%). Likewise, beta and gamma - proteobacteria had lower ( $P \leq 0.01$ ) representation *in vitro* than *in vivo* which explained the lower percentage of Proteobacteria in fermenters (29.2%) than in the rumen (33.5%). The proportion of unmatched fragments including data from the 4 enzymes was 10.3% and 12.4% *in vivo* and *in vitro*, respectively, whereas the percentage of uncultured phyla found were 11.0% for rumen and 10.6% for fermenters.

**Table 2. Bacterial diversity composition of the most important phylum and classes following phylogenetic assignments.**

| Items  | System |           | SEM <sup>4</sup> | P-value |
|--|--------|-----------|------------------|---------|
|  | Rumen  | Fermenter |                  |         |
| Relative number of assignments, % <sup>1</sup> |        |           |                  |         |
| Firmicutes                                     | 33.5   | 38.4      | 0.81             | 0.005   |
| Bacilli  | 10.0   | 11.1      | 0.54             | 0.35    |
| Clostridia                                     | 20.4   | 23.9      | 0.58             | 0.005   |
| Mollicutes                                     | 2.58   | 3.03      | 0.17             | 0.21    |
| Uncultured <sup>2</sup>                        | 0.52   | 0.45      | 0.044            | 0.49    |
| Proteobacteria                                 | 33.5   | 29.2      | 0.63             | 0.02    |
| Alfa   | 3.45   | 3.39      | 0.29             | 0.91    |
| Beta   | 11.2   | 8.35      | 0.35             | <0.001  |
| Gamma  | 9.02   | 6.87      | 0.41             | 0.01    |
| Epsilum  | 0.11   | 0.17      | 0.028            | 0.34    |
| Delta  | 8.93   | 9.61      | 0.33             | 0.32    |
| Uncultured                                     | 0.72   | 0.65      | 0.082            | 0.66    |
| Actinobacteria                                 | 7.28   | 5.57      | 0.47             | 0.18    |
| Bacteroidetes                                  | 7.31   | 7.00      | 0.41             | 0.71    |
| Uncultured                                     | 11.0   | 10.6      | 0.26             | 0.53    |
| Unmatched fragments <sup>3</sup> , %           | 10.3   | 12.4      | 0.51             | 0.22    |

<sup>1</sup> Number of phylogenetic assignments made from matched fragments belonging to the phyla or class specified divided by the total number of phylogenetic assignments (Kent *et al.*, 2003).

<sup>2</sup> Uncultured refers to assignments of bacteria unable to grow or unidentified. When it is present within a phylum means that no information on genus and species level exists but the sequence allowed to classified it within that class or phylum

<sup>3</sup> Percentage of T-RFs that are not matched to any organism in the database

<sup>4</sup> SEM: Standard error of the mean

Diversity of bacterial communities present in the rumen and fermenter contents samples is shown in Table 3. Diversity, estimated from the Shannon indices, was similar ( $P > 0.05$ ) *in vivo* and *in vitro* except for fermenters fed 45 g dry matter (DM) per day of high concentrate diets which promoted the lowest ( $P$

< 0.05) pH (5.80). Total bacteria biomass, expressed as bacterial DNA per microlitre of extract, was similar in fermenters content than in rumen content.

**Table 3. Average pH, total bacteria and Shannon diversity indices values for goats rumen and single-flow continuous culture fermenters fed either high or low concentrate diets.**

|                           | RUMEN              |                    | FERMENTER               |                   |                          |                    | SEM <sup>3</sup> |
|---------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|-------------------|--------------------------|--------------------|------------------|
|                           | HC <sup>1</sup>    | LC <sup>2</sup>    | Low Intake <sup>3</sup> |                   | High Intake <sup>4</sup> |                    |                  |
|                           |                    |                    | HC                      | LC                | HC                       | LC                 |                  |
| Observations, n           | 8                  | 8                  | 4                       | 4                 | 4                        | 4                  |                  |
| pH                        | 6.24 <sup>bc</sup> | 6.43 <sup>ab</sup> | 6.22 <sup>bc</sup>      | 6.61 <sup>a</sup> | 5.80 <sup>d</sup>        | 6.00 <sup>cd</sup> | 0.028            |
| Total bacteria, ng DNA/μl | 93.8               | 78.8               | 75.5                    | 72.6              | 78.7                     | 79.4               | 9.6              |
| Shannon Index             | 3.37 <sup>a</sup>  | 3.35 <sup>a</sup>  | 3.37 <sup>a</sup>       | 3.42 <sup>a</sup> | 3.13 <sup>b</sup>        | 3.44 <sup>a</sup>  | 0.022            |

<sup>1</sup> HC: samples from experimental units fed high concentrate diets

<sup>2</sup> LC: samples from experimental units fed low concentrate diets

<sup>3</sup> 30 g dry matter/d

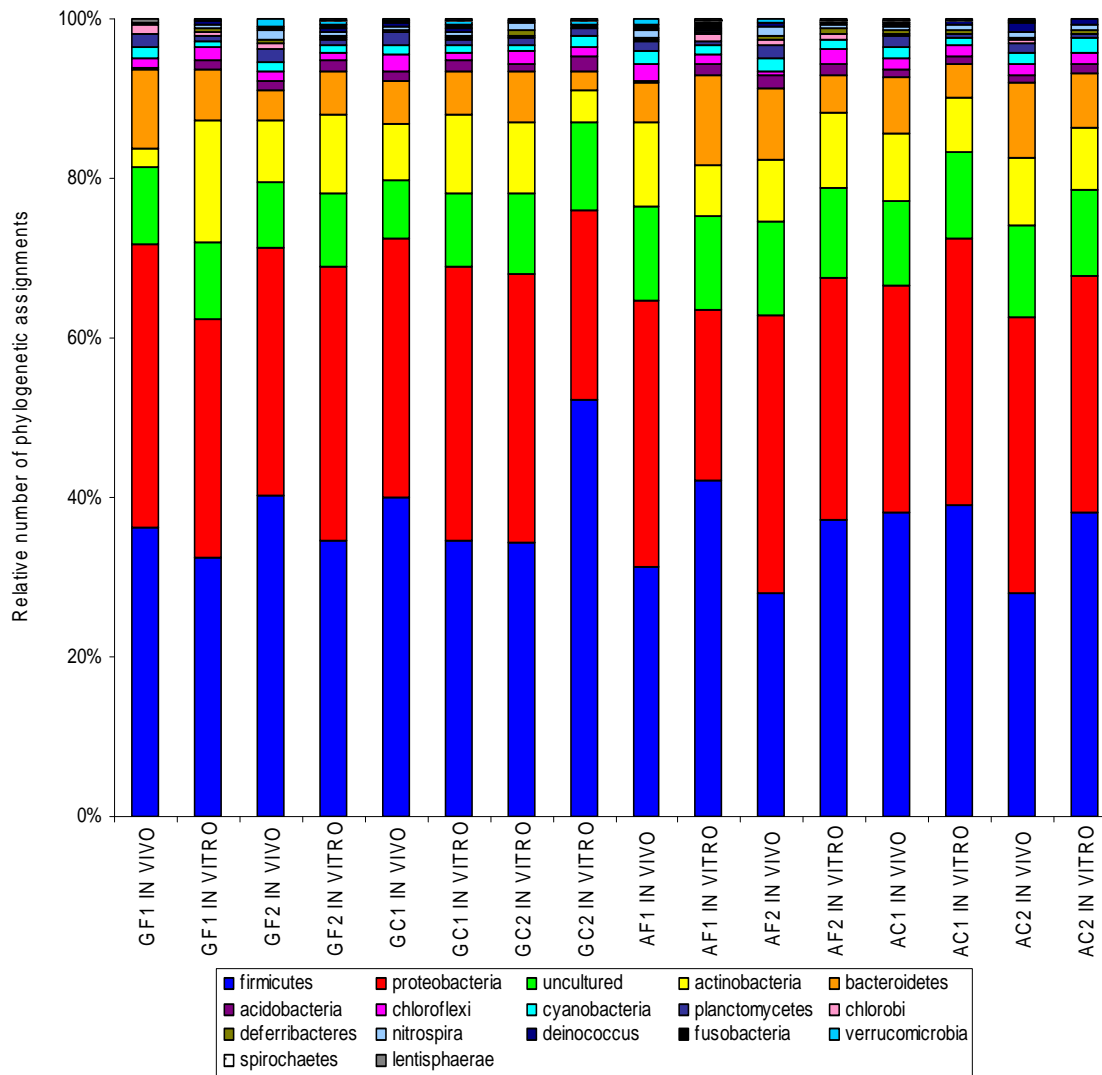
<sup>4</sup> 45 g dry matter/d

<sup>3</sup> SEM: Standard error of the mean

### **Rumen and fermenters content vs. their respective bacterial pellets**

Figure 4 shows dendrograms based on Hellinger distances obtained from T-RFLP profiles. In the dendrogram for *in vivo* samples (left) a general trend for bacterial pellets to group together based on the diet received seems to exist. However in the case of rumen content although samples grouped together apart from most of bacterial pellets the influence of diet is not evident.

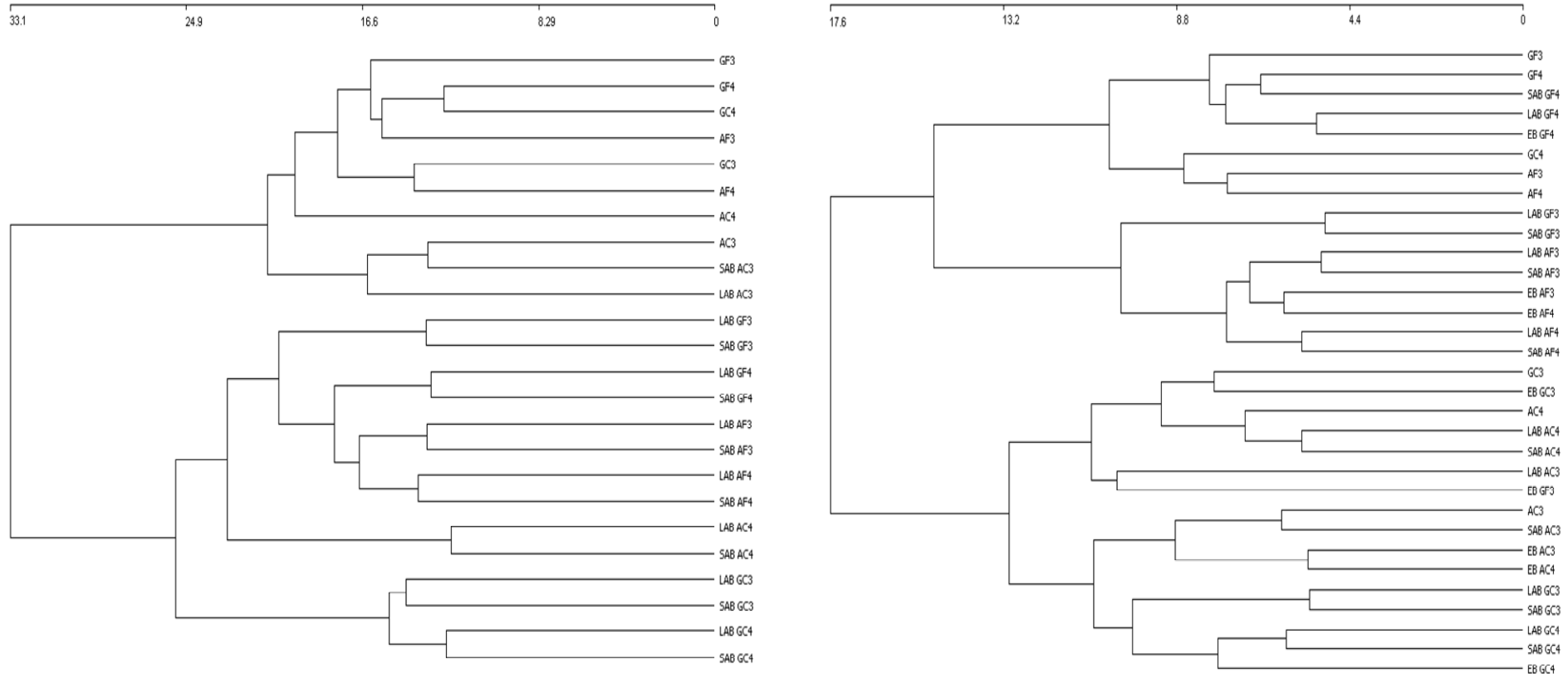
The SIMPER analysis showed greater similarity for rumen content and SAB (39.7%) than for rumen content and LAB (35.8%). On the other hand, the dendrogram for *in vitro* samples (right) shows a different scenario: both bacterial pellets and fermenter contents separation is based on the level of concentrate in the diet. Although there is some degree of similarity for some fermenters content samples and their respective bacterial pellets, it is clear that samples (content and pellets) from the same fermenter do not always cluster as a discrete entity. Likewise for rumen contents those from fermenters had greater similarity with SAB (35.5%) compared to LAB (29.4%) or EB (30.2%).



**Figure 3. Bacterial diversity at phylum level following phylogenetic assignments. The thick black line denotes a division based on system, whilst the thin dashed lines show division by diet. GF = grass hay low concentrate; GC = grass hay high concentrate; AF = alfalfa hay low concentrate; AC = alfalfa hay high concentrate.**

The PCA analysis in Figure 5 corroborates results showed by dendrograms both for *in vivo* and *in vitro* samples. The *in vivo* PCA plot (left) showed different position for bacterial pellets from animals fed different diets, being close in the space pellets from animals fed low concentrate diets (GF and AF). In addition, samples of rumen content tend to cluster separately from most of the bacterial pellets similar to what shown in dendrograms.





**Figure 4.** Dendrograms illustrating the relationship between bacterial community, elucidated by T-RFLP, from goat rumen (left) and fermenters (right) contents fed the experimental diets and the isolated bacteria. Scaled bars above figure indicate Hellinger Distances. Percentages of similarity (SIMPER) are for *in vivo* samples: rumen content (41.9%), rumen content and LAB (35.8%) and rumen content and SAB (39.7%); and for *in vitro* samples: fermenter content (39.5%), fermenter content and LAB (29.4%), fermenter content and SAB (35.5%) and fermenter content and EB (30.2%) GF = grass hay low concentrate; GC = grass hay high concentrate; AF = alfalfa hay low concentrate; AC = alfalfa hay high concentrate; LAB = liquid associated bacteria; SAB = solid associated bacteria; EB = bacteria isolated from effluents.

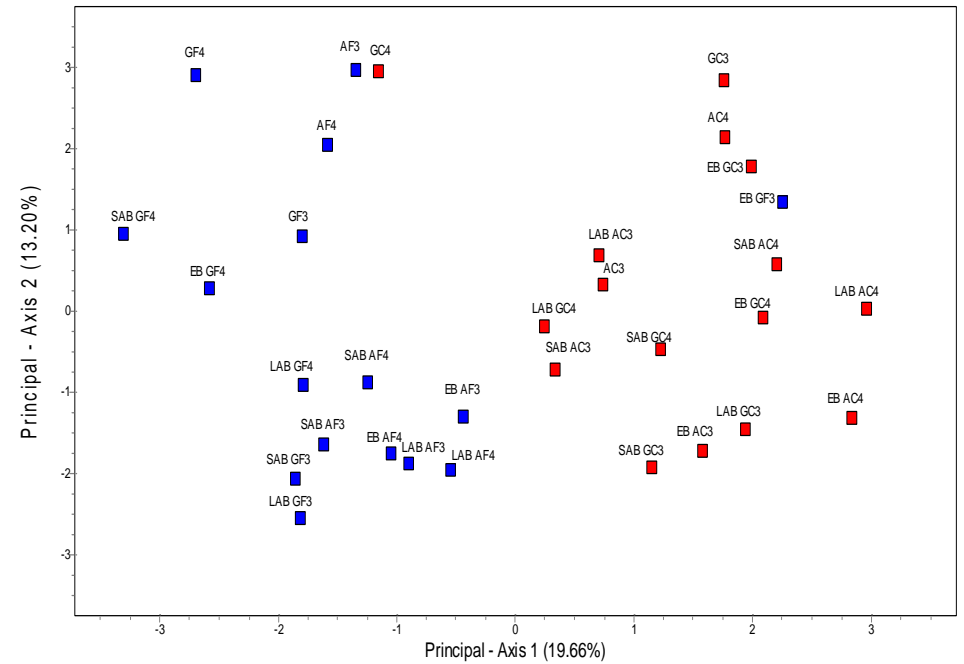
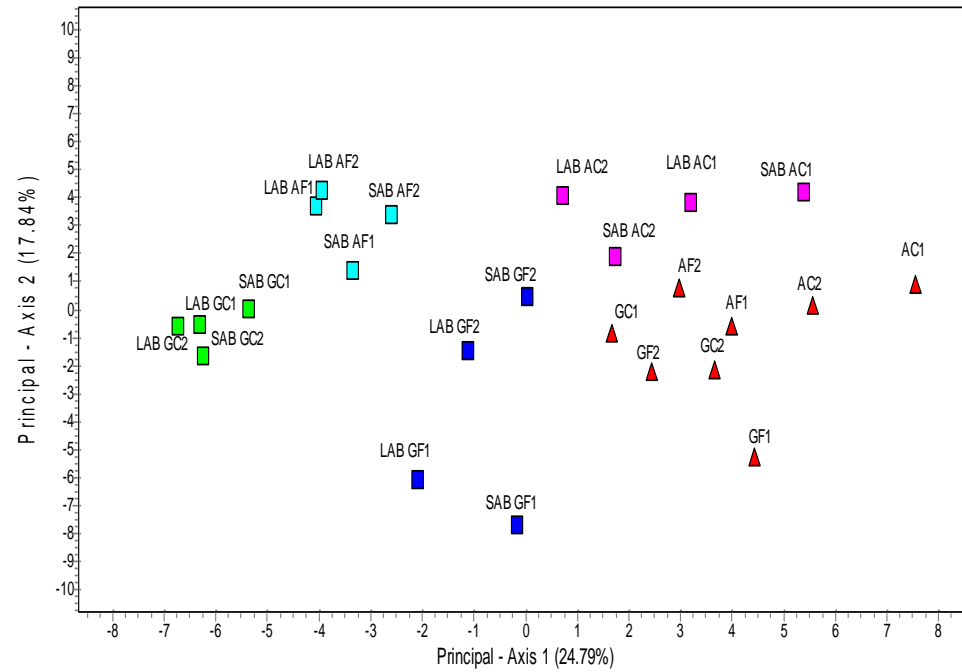
In the *in vitro* PCA plot (right) the results agree with dendrogram in Figure 4, clustering samples in two groups according to the level of concentrate in the diet. Moreover this *in vitro* PCA plot on the second axis slightly separated most of the fermenters content from bacterial pellets regardless the level of concentrate in diet.

The prediction model from the discriminant analysis (DA) allocated the LAB and SAB isolated from rumen and fermenter contents into one of the 4 dietary categories (GF, GC, AF and AC) regardless their origin (Figure 6). The LAB and SAB samples tended to fall in their correct dietary category with a high accuracy: 87.5% for diets GF, GC and AF and 100% for diet AC. Axis 1, which explains almost 91% of the variability in the model, separated perfectly diets GC, AF and AC but failed to group together samples from animals or fermenters fed diet GF, which were close to samples for both diets GC or AF.

## **Discussion**

Several studies have demonstrated that continuous-culture fermenters can be used to simulate the fermentative process occurring in the rumen (Hannah *et al.*, 1984; Mansfield *et al.* 1995; Carro *et al.*, 2009). However, most of them did not provide information concerning the microbial communities mediating the fermentative process in both the rumen and fermenters despite microbiota being one of the most important criteria to validate *in vitro* systems (Warner, 1956).

There are few studies including direct comparisons between microorganisms in rumen and continuous-culture fermenters, and most have used culture based methods (Slyter and Putnam, 1967; Mansfield *et al.*, 1995) with few based on molecular approaches (Ziemer *et al.* 2000; Muetzel *et al.*, 2008). Considering that only a small fraction of the total microbial communities in natural ecosystems can be recovered by culture based methods (Amann *et al.*, 1995) it is not clear whether description based on these techniques accurately reflects bacterial species distribution in the rumen. The application of molecular techniques to microbial ecology studies offers several advantages over conventional culture-based techniques and allows the study of genetic diversity and phylogenetic relationships of microorganisms to be evaluated in different ecosystems without cultivation.



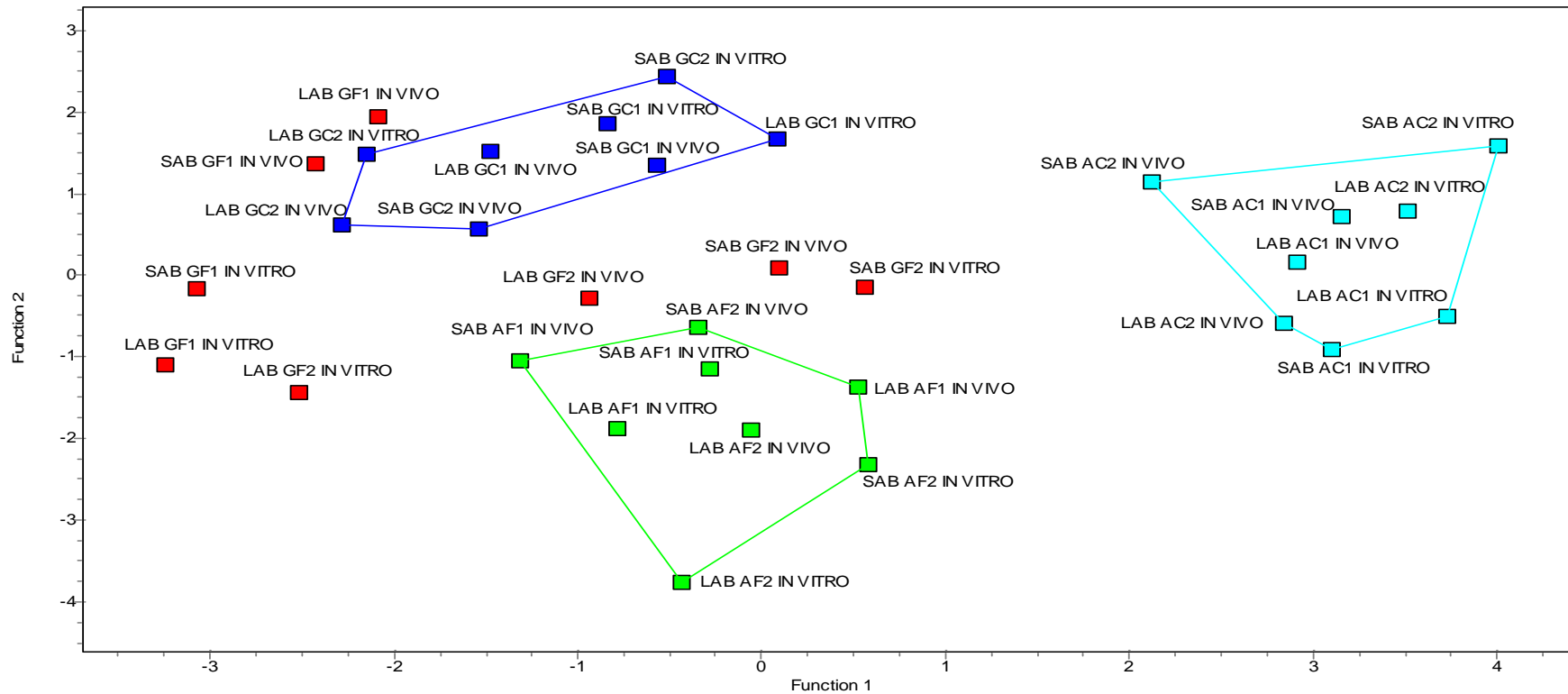
**Figure 5.** PCA covariance plot showing the relationship from rumen (left) and fermenters (right) content and bacteria isolated fed 4 different diets. GF = grass hay low concentrate; GC = grass hay high concentrate; AF = alfalfa hay low concentrate; AC = alfalfa hay high concentrate; LAB = liquid associated bacteria; SAB = solid associated bacteria; EB = bacteria isolated from effluents

Molecular methods including fingerprinting techniques based on 16S rRNA genes which allow the analysis of large number of samples and offer tools to detect differences in the composition and structure of microbial communities. The T-RFLP analysis is one of the most frequently used fingerprinting methods and was utilized in the present study to compare the composition of bacterial communities in goat rumen and in single-flow continuous-culture fermenters. The present study may be worthy and novel for explaining differences concerning ruminal fermentation found between rumen and continuous-culture fermenters since there are almost no studies comparing bacterial fingerprints in both systems.

The PCR products were submitted to 4 different enzymatic digestions and the profiles obtained with every enzyme were combined to yield a detailed profile of bacterial communities present in each sample. Several studies have demonstrated that the use of more than one restriction enzyme facilitates the resolution of bacterial populations by T-RFLP (Liu *et al.*, 1997; Marsh 1999) since different bacterial communities can share the same terminal restriction fragment length for a particular primer-enzyme combination but not others (Marsh *et al.* 2000). Moreover, the use of multiple digestions is recommended to accomplish any degree of phylogenetic identification based on T-RFLP data (Kent *et al.* 2003). Therefore, the analysis presented in this study was carried out with the information provided by a combination of 4 different enzymatic digestions.

#### *Rumen vs. fermenter contents*

Differences regarding bacterial community structure in the rumen and in fermenters are evident in the present study as shown in Figures 1 and 2. However, bacterial population size elicited by qPCR and diversity revealed by the Shannon index were not different in most fermenters (those with pH  $\geq$  6.00) compared to rumen samples (Table 3), which supports statements made by Strobel *et al.* (2008) on the suitability of fermenters as an *in vitro* model able to adequately maintain the ruminal microbial communities based on numbers and diversity. However a similar bacterial diversity does not necessarily involve a similar bacterial population structure.



**Figure 6.** Discriminant analysis of the relative frequencies of bacterial OTUs in T-RFLP profiles of 16S rRNA genes amplified from solid (SAB) and liquid (LAB) associated bacteria isolated from the rumen of goats (*IN VIVO*) and from a continuous culture system content (*IN VITRO*) fed 4 different diets. GF = grass hay low concentrate; GC = grass hay high concentrate; AF = alfalfa hay low concentrate; AC = alfalfa hay high concentrate. Percentages of correct (predicted/original) estimated by the model are: 87.5, 87.5, 87.5, 100% for GF, GC, AF, AC, respectively. Function 1 account for 90.9% ( $P < 0.001$ ) and function 2 for 7.24% ( $P < 0.001$ )

Ziemer *et al.* (2000) compared the microbial population structure in dual-flow continuous-culture fermenters and in the rumen using ribosomal targeted DNA probes. They stated that fermenters maintained some key microbial groups in proportions and numbers similar to those found in the rumen, which along with the similarities in fermentation and digestion characteristics, indicated that the model was able to maintain a functional community structure similar to that in the rumen. However Ziemer *et al.* (2000) reported important differences in the Gram positive group between rumen and fermenters which might support the hypothesis that bacterial structure in fermenters differs from that in the rumen. Slyter and Putman (1967) using culture-based methods concluded that bacterial populations developed in continuous-culture fermenters were quite similar to those in the rumen and that fermenters maintained bacterial communities over the long term which were reasonably similar to those in the rumen of animals fed the same diet. Mansfield *et al.* (1995) using also culture-based techniques found that dual-flow continuous-culture fermenters maintained similar numbers of amylolytic and proteolytic bacteria compared to the rumen, but failed to maintain the number of cellulolytic bacteria. Although relevant and valuable information can be obtained from a functional point of view the mentioned comparisons do not contribute to clarify the degree of bacterial structure similarity between rumen and fermenters. The similarity percentage between *in vivo* and *in vitro* samples in the present work was low (32.7%) compared to that within rumen samples (42.8%). This may due to the high bacterial composition variability within fermenter samples as shown by their low similarity percentage (35.5%). This would be in contrast with the general belief that *in vitro* systems involve less individual variability than observed among animals.

Many factors may cause differences in bacterial communities between rumen and fermenter samples. Differential dilution rates *in vivo* and *in vitro* together with a poor representation of the total ruminal bacterial structure in the inoculum used for fermenters may be of importance. One limitation in single-flow compared to dual-flow continuous-culture fermenters is that dilution rates in liquid and solid digesta phase are the same which may compromise the survival of high generation time microorganisms associated to the liquid phase. The decrease or the lack of protozoa in fermenters has been widely described, estimated either by direct counts (Mansfield *et al.*, 1995; Moumen, 2009) or by

molecular approaches (Sharp *et al.*, 1998). Protozoa absence in fermenters could be responsible for the bacterial community shifts (Ozutsumi *et al.*, 2005) in fermenters compared to the rumen. Alternatively liquid associated bacteria in the fermenters could be retained longer than in the rumen increasing their number and changing their proportion which would affect, in turn, the profile observed in the T-RFLP analysis. Since the inoculum for fermenters was primarily the liquid fraction of rumen content and no procedure to detach solid associated bacteria was used to prepare the inoculum in the present study under-representation of SAB community may exist. In contrast, Ziemer *et al.* (2000) found that although there was less microbial biomass in the fermenters inoculum compared to rumen content, community structure was not significantly altered during *in vitro* incubations but information regarding the species level was very scarce as only some strains of *fibrobacter* were identified.

The information provided in this study concerning the relative number of assignments to the most important phylum and class level should not be considered as relative abundance of organisms such as the phylogenetic affiliation made using clone libraries (Whitford *et al.*, 1998; Tajima *et al.*, 1999; Ozutsumi *et al.*, 2005) or ribosomal targeted DNA probes (Ziemer *et al.*, 2000). However it may be considered as a measure of diversity composition since the assignments conducted by phylogenetic assignment tool (PAT) do not take into account the intensity of TRF peaks as a measure of abundance. This is crucial when trying to compare our results concerning T-RFLP phylogenetic assignments with the phylogenetic affiliation made by other authors. In the present study low G+C Gram positive bacteria, ascribed to Firmicutes phylum, and Proteobacteria phylum accounted for a greater and lower percentage of the total diversity, respectively, in fermenters than in the rumen. Given the liquid nature of fermenters inoculum that composition of diversity seems to be in contrast to the observations made by Tajima *et al.* (1999) in the rumen of cows where low G+C Gram positive bacteria were predominantly associated with rumen solids compared to rumen fluid. Nevertheless, the lack of stratification in fermenters content in comparison to the rumen one could have lead to us sampling greater proportion of feed particles in the former. Similarly Ziemer *et al.* (2000) found a numerically higher relative abundance of Gram-positive

bacteria, including Firmicutes and Actinobacteria phylum, in the rumen (58.3%) than in dual-flow continuous-culture fermenters contents (45.8%) sampled after 7d of incubation. The Clostridia class includes numerous known rumen cellulolytic bacteria such as *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Eubacterium cellulolyticum*, *Clostridium longisporum* and *Clostridium locheadii*. The percentage of total diversity explained by this class was greater in fermenters than in the rumen despite the number of absolute assignments being similar (132 vs. 125 for rumen and fermenters, respectively, data not shown). Assuming that the greater diversity explained by Clostridia involves a higher percentage of the total assignments corresponding to cellulolytic bacteria, it might be suggested that in fermenters the proportion of cellulolytic species (diversity explained) was higher than in the rumen. Mansfield *et al.* (1995) found less cellulolytic bacteria numbers in fermenters than in the rumen whilst Slyter and Putnam (1967) and Muetzel *et al.* (2008) found no difference in the number and proportion, respectively, of cellulolytic organisms when comparing continuous-culture fermenters with the cow rumen.

#### *Rumen and fermenters content vs. their respective bacteria pellets*

To study how well the bacterial communities in SAB, LAB and EB pellets represent those found in whole ruminal or fermenter contents and, to investigate which type of pellet might better describe samples from rumen and fermenters contents in terms of the whole bacterial communities, the relationship of 8 rumen and fermenter content samples and their respective bacterial pellets were analyzed by both clustering dendrograms and PCA ordination analysis.

Differences found in bacterial communities between rumen content and most bacterial pellets regardless their origin were evident. These differences may be due to the different volume collected for both types of samples, the one used to isolate bacteria being around 20 times bigger than the rumen content sample. Several authors (Ozutsumi *et al.*, 2005; Sadet *et al.*, 2007) have demonstrated that rumen fluid, solid digesta and the rumen epithelium support different microbial populations, a more representative rumen microbial population might be achieved by collecting samples from all those different niches. Because of the stratified nature of the rumen contents and the resulting



environment variety, substantial differences exist in microbial populations among samples sites (Bryant and Robinson, 1968). Therefore, one of the possible causes for content and bacterial pellets samples being apart in both the dendrogram and PCA plot *in vivo* and *in vitro* may be the different bacteria representativity accomplished as samples were collected.

In contrast, *in vitro* samples seem to be grouped mainly by the level of concentrate in the diet fed to the fermenter and, therefore, the pH value reached, and this effect may disguise the observed separation between content and bacteria samples found *in vivo*. This clear separation of bacterial communities based on pH found in fermenters, could explain the reported differences in fermentation parameters and digestibility due to pH variations (Calsamiglia *et al.*, 2002). Dendrograms and PCA plots did not reveal adequately which bacterial fraction had a greater similarity with the content they were isolated from. However, SIMPER analysis made both for *in vivo* and *in vitro* samples indicated that SAB had a numerically higher similarity percentage with rumen or fermenter contents compared to the other isolated bacteria pellets, likely because this fraction is numerically more important than LAB, accounting up to 75% of the total microbial mass in the rumen (Craig *et al.*, 1987).

A discriminant analysis was carried out with LAB and SAB from rumen and fermenters which allowed us to verify if samples would group according to the diet received regardless their origin (*in vivo* or *in vitro*) and, therefore, overcoming differences found in this experiment between bacteria samples from rumen and fermenters (data not shown). Since only bacteria samples, unlike content samples, tend to group together based on the diet received both *in vivo* and *in vitro*, likely owing to a more adequately sampling, bacteria samples and not content samples were subjected to the discriminant analysis.

The DA analysis showed that the similarity between *in vivo* and *in vitro* SAB and LAB was higher for samples obtained from animals or fermenters fed the same diet. That supports the hypothesis that although differences in bacterial communities can exist between goats rumen and single-flow continuous-culture fermenters, the *in vitro* system can arrange samples according to its bacterial structure similarly to what occurs *in vivo*. In this sense, Molina-Alcaide *et al.*

(2009) reported the potential of fermenters to sort diets similarly to *in vivo* experiments for some ruminal fermentation parameters.

Clear differences in bacterial structure between goats rumen and single-flow continuous-culture fermenters were found in the present study likely due to environmental changes and an inadequate inoculum preparation for *in vitro* experiments. However, similar or higher diversity and total bacteria numbers in fermenters compared to the rumen, along with the ability of fermenters to discriminate the bacteria pellets (LAB and SAB) according to the diet received similarly to what occurs *in vivo*, may indicate that these *in vitro* technologies has some potential from an ecological point of view to arrange treatments likewise what occur in the rumen. The results presented here support the hypothesis that solid associated bacteria are more representative of the whole bacterial community both in rumen and in fermenters that are liquid associated bacteria or effluent bacteria. Therefore it should be necessary to consider this bacterial pellet as reference for microbial nitrogen flow estimations.

## **Experimental procedures**

### *Experimental units, treatments and design*

Four dry non-pregnant Granadina goats ( $46.3 \pm 2.96$  kg body weight) fitted with permanent ruminal cannula and 4 single-flow continuous-culture fermenters (Miettinen and Setälä, 1989) were used in two linked 4 x 4 Latin square designs with 2 x 2 arrangement of treatments. Two forages, grass hay (G) and alfalfa hay (A), and 2 forage to concentrate ratios, 70:30 (F) and 30:70 (C), were used to elaborate 4 different diets (referred as GF, GC, AF and AC). Diets were offered to animals at 20% above energy maintenance requirements (Prieto *et al.* 1999) whereas fermenters were fed daily either 30 g dry matter (DM) in periods I and II or 45 g DM in periods III and IV. Both animals and fermenters were fed twice a day at 0800 and 1400. The *in vitro* experimental periods were run concurrently with the respective *in vivo* period. The four fermentation flasks were inoculated with ruminal fluid from 4 goats fed the same diet being supplied to the corresponding fermentation flask. Adaptations to diets included 17 d for animals and 7 d for fermenters. *In vitro* flow through fermenters was maintained by continuous infusion of McDougall (1948) artificial

saliva to provide a dilution rate of about 5.33/h, and CO<sub>2</sub> was continuously infused to keep anaerobic conditions. The effluent from each fermenter was collected into a vessel maintained at 3° C to prevent microbial growth.

### *Samples collection*

#### *In vivo trials*

After animals adaptation to the experimental diets on d 17 a 50 mL rumen content sample was collected from each animal 2 h after the morning feeding through the cannula in a 50 ml sterile tube and kept at - 20°C before lyophilisation and DNA extraction. In periods III and IV on d 22 about 1L of rumen content was collected from each animal with a manual vacuum, placing the hose in different parts of the rumen to isolate SAB and LAB following the procedure described by Martín-Orúe *et al.* (1998). On d 24 the rumen content was obtained for single-flow continuous-culture fermenters inoculation similarly to the collection previously described for bacterial pellets isolation.

#### *In vitro trials*

After fermenters adaptation to the experimental diets on d 8 of every incubation run a 15 mL sample of the fermentation flasks content was collected two h after the morning feeding by using a sterile eppendorf tube and was kept at -20°C before lyophilisation and DNA extraction. On d 12 in periods III and IV, the whole content of each fermentation flask was collected to isolate SAB and LAB. The effluent produced was also collected to isolate total bacteria (EB).

### *DNA extraction*

Freeze dried samples were kept at – 80° C for 5 min before being beaten at maximum speed in a Minibeadbeater™ (Biospec products Inc., Bartlesville, Oklahoma) for 1 minute. Total genomic DNA was then extracted using QIAGEN QIAmp DNA stool mini kits (Qiagen Ltd, West Sussex, UK) following the manufacturer's instructions but using a higher temperature (95°C) for the lysis incubation.

### *PCR*

The PCR was used to amplify approximately 1,300 bp of 16S rRNA gen for T-RFLP analysis. Amplification reactions contained 0.05 U/μl Taq DNA

polymerase (Promega), 1 x reaction buffer as supplied by the manufacturer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 μM of each primer, and 0.2 mM of each dNTPs with 1 μl of extracted DNA in a final volume of 25 μl. The bacterial-specific primer pair used (Hongoh *et al.*, 2005) were cyanine labelled 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTG AG-3') and unlabelled 1389R (5'-AGG GGG GGT GTG TAG AAG-3'). Reactions were carried out in a BIORAD MyCycler™ thermal cycler with an initial denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 25 cycles at 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute, with a final extension carried out at 72°C for 2 minutes. The PCR product was purified on a Millipore MultiScreen® PCR<sub>μ96</sub> plate (with 20 inches Hg vacuum). The DNA concentration within each sample was determined by spectrophotometry (Nanodrop® ND-1000 spectrophotometer). The PCR products were digested with HaeIII, HhaI, MspI and RsaI enzymes. Enzymatic reactions were performed by using 0.25 U/μl of *HaeIII* and 0.15 U/μl of *HhaI*, *MspI* and *RsaI* for 5 h at 37°C. The product of digestion was then purified and precipitated by washing with 70% ethanol several times. The precipitated product was dried and resuspended in 35 μl of SLS buffer solution (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) and added to 0.2 μl DNA standard 600. Terminal Restriction Fragments (TRFs) were determined using Local Southern Algorithm, calibrated by using AE version 2 (manufacturer's recommendation, CEQ™ 8000 Beckman Coulter software) and aligned using the AFLP (amplified fragment length polymorphism) facility in the CEQ™ 8000 software. To include all the detected peaks, data were first analysed when exported with slope threshold of 1% and relative peak height of 0% within the CEQ™ 8000 software. Subsequently, to remove the smaller peaks detected a percentage threshold for relative height of 0.5% was applied. This allowed us to minimize the correlation between total peaks area and number of peaks and, as a consequence, to minimize differences due to variation in the injected amount of DNA (Sait *et al.* 2003).

#### *Analysis of terminal restriction fragment (TRF) patterns*

Analysis of TRF's in samples was performed by using two different algorithms: a combination of Hellinger distance or Euclidean distance between profiles after square root transformation of relative peak heights (Legendre and Gallagher, 1998) and Ward's method analysis (SAS Institute, Inc.) to construct

the dendrograms; and Principal Component Analysis (PCA) to obtain the ordination analysis. In addition a similarity percentage (SIMPER) analysis which is shown as footnote in dendrograms figures was carried out to compare samples groups. Discriminant Analysis (DA) was applied to detect differences among treatments regardless of the system (*in vivo* vs.. *in vitro*) in such a way that regardless of differences between *in vivo* and *in vitro* in microbial communities samples could group according to diet without taking into account the samples origin. All analyses were carried out by CAP 4 software (Pisces Conservation Ltd., Lymington, Hampshire, UK).

The Shannon Diversity Indices were also calculated as a measure of microorganisms abundance in each community (Shannon and Weaver, 1963). The Shannon indices as well as pH and total bacteria were tested for significant differences between systems using one way analysis of variance (ANOVA) by SPSS (SPSS v.15, Michigan Avenue, Chicago, IL).

#### *Bacterial identification*

Phylogenetic assignment was also conducted on the terminal restriction fragments detected. Because each potential bacterial species identified was only recorded as present or absent, the slope threshold was raised (slope threshold and relative peak height of 10%) to ensure that no noise was included whilst attempting to identify bacteria present in the samples. A database of all potential bacterial species that could be identified using 27F and 1389R primer pair and HaeIII, HhaI, MspI and RsaI restriction enzymes was created using the Virtual digest (ISPaR) facility within MiCA (Microbial Community Analysis III; <http://mica.ibest.uidaho.edu/digest.php>) and then modified so that bacterial species with identical TRF lengths for each restriction enzyme were reduced to one entry in the database. Phylogenetic assignment of TRFs for each sample was then determined by using a web-based (<http://trflp.limnology.wisc.edu>) phylogenetic assignment tool (PAT; Kent *et al.*, 2003). A polynomial size tolerance (1.0, 1.5 and 4.0 bp of tolerance up to 200, 400 and 600 bp length, respectively) was chosen to accommodate discrepancies between predicted and observed TRF length, taking into account that uncertainty in size calling increases with increasing fragment length (Kent *et al.*, 2003). The relative diversity is shown as bar graphs for all major phyla, representing the number of

different identified bacterial species which belong to that hierarchical level and does not reflect abundance of a specific bacterial species. In order to establish statistical differences in the relative numbers of phylogenetic assignments for the most important phyla between the two systems one way ANOVA analysis was carried out. When differences existed an analysis of class level was carried out as well. The PAT generates a list of fragments that are not matched to species in the database, because either they are derived from previously uncharacterized bacteria or there is not enough information to make a match since the 16S rRNA sequence is not complete. Unmatched TRFs may also occur when an organism falls below the peak threshold with at least one of the enzymes used. Uncultured phyla refer to fragments matched to restriction sites in the database, but because little or no phylogenetic information is deposited for their sequences, it was not possible to determine phylum identity belonging to the fragment pattern. When the term uncultured exists within a phylum it means that no information on genus and species level exists but the deposited sequence allows us to classify them within a phylum and class.

#### *Real time quantitative PCR (qPCR)*

Quantification of total bacteria in rumen and fermenter contents was measured by qPCR. The 16S rRNA gene-targeted primer sets used in this study were: forward-5'-CGGCAACGAGCGCAACCC-', reverse-5'-CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC-3' (McSweeney and Denman, 2007).

Three replicates of DNA extracts were used. A no-template (sterile distilled water) negative control was loaded on each plate run to screen for possible contamination and dimer formation and to set the background fluorescence for plate normalization. Real-time PCR was performed using a DNA Engine Opticon® System, PTC-200 DNA Engine™Cycler (MJ Research, UK). One µl of DNA extract was added to amplification reactions (50 µl) containing 50 pmol of each primer, 25 µl of SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma, Poole, Dorset, UK) containing 20mM Tris-HCl, pH 8.3, 100 mM KCl, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM each dNTP, stabilizers, 0.05 unit/µl Taq DNA Polymerase, JumpStart Taq, antibody, and SYBR Green I. Cycling conditions were 95°C for 5 min; 40 cycles of 95°C for 15 s, 55°C for 15 s, 72°C for 30 s. Fluorescence readings were taken after each extension step, and a

final melting analysis was obtained by slow heating with 0.1°C/s increment from 45 to 95 °C, with fluorescence collection at 0.2°C intervals. The threshold cycle (i.e., the amplification cycle in which product formation exceeds background fluorescence) of each sample was determined during the exponential phase of amplification. All post run data analyses were performed using MJ Research Opticon Monitor Software (Version 1.06, UK).

Total bacterial rDNA concentration was measured using a bacterial rDNA standard curve, that was generated from DNA extracted from a mix (equal volumes) of 24 h cultures of the following rumen bacterial strains all grown on Hobsons medium 2 (Hobson and Stewart, 1997): *Prevotella ruminicola* 23, *Butyrivibrio fibrisolvens* SH13, *Ruminococcus albus* SY3, *Prevotella albensis* M384, *Clostridium sticklandii* 12662, *Peptostreptococcus anaerobius* 27337, *Ruminococcus flavefaciens* Fd1, *Mitsuokella multiacidus* 46/5, *Selenomonas ruminantium* 2388, *Lachnospira multipara* D15d, *Veillonella parvula* L59, *Prevotella bryantii* B14, *Prevotella brevis* GA33, *Lactobacillus casei* LB17, *Clostridium aminophilum* 49906, *Streptococcus bovis* ES1 and *Megasphaera elsdenii* J1 all obtained from the Rowett Research Institute (Aberdeen, UK) culture collection. Concentration was expressed as ng of DNA per µL of the DNA extract.

#### *Chemical analysis*

Diet ingredients were dried in a forced air oven at 60 °C for 48 h and ground through a 1-mm sieve before being analyzed. The DM (method ID 934.01), ash (method ID 942.05), and N (method ID 984.13) contents were determined according to the AOAC (2005). The NDF and ADF contents were analyzed according to Van Soest *et al.* (1991) using an ANKOM Model 220 Fiber Analyzer (Macedon, NY). The α-amylase was used for NDF analysis in concentrate and feces samples. Both NDF and ADF were expressed exclusive of residual ash. *In vitro* DM and organic matter (OM) digestibility of diet ingredients was determined according to the procedure described by Tilley and Terry (1963), using an ANKOM Model Daisy Incubator (Macedon, NY).

#### **Acknowledgements**

This research was supported by the C.I.C.Y.T. of Spain (Project AGL2004-04755-C02-02). G. Cantalapiedra gratefully acknowledges support from Ministerio de Ciencia e Innovación for FPU grant. Thanks to J. Fernandez, I. Jiménez, B. Macias and V. Toledano for technical assistance and to E. Pinloche and T. Blackmore for data analysis support.

## References

- Amann, R.I., Ludwig W., and Schleifer K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143-169.
- AOAC (2005) Official Methods of Analysis, 17th ed. Assoc. Offic. Anal. Chem. Arlington, VA.
- Bryant M.P., and 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.
- Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Cardozo P.W., and Kamel C. (2005) Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *J Anim Sci* **88**: 2508-2516.
- Calsamiglia S., Ferret A., and Devant M. (2002) Effects of pH and pH fluctuations on microbial and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J Anim Sci* **85**: 574-579.
- Carro M.D., and Miller E.L. (2002) Comparison of microbiol markers (15N and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. *Anim Sci* **75**: 315-321.
- Carro M.D., Ranilla M.J., Martin-Garcia A.I. and Molina-Alcaide E. (2008) Comparison of microbial fermentation of high- and low-forage diets in sheep rumen, Rusitec and single-flow continuous-culture fermenters. doi:10.1017/S1751731108003844. *Animal*.
- Cecava M.J., Merchen N.R., Gay L.C., and Berger L.L. (1990) Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. *J Dairy Sci* **73**: 2480-2488.
- Craig W.M., Broderick G.A., and Ricker D.B. (1987) Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. *J Nutr* **117**: 56–62.



- Dunbar J., Ticknor L.O., and Kuske C.R. (2001) Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* **67**: 190-197.
- Garcia-Lopez P.M., Kung L., Odom Jr., and Odom J.M. (1996) *In vitro* inhibition of microbial methane production by 9,10-anthraquinone. *J Anim Sci* **74**: 2276-2284.
- Gomez J.A., Tejido M.L., and Carro M.D. (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.
- Hannah S.M., Stern M.D., and Ehle F.R. (1986) Evaluation of a dual flow continuous culture system for estimating bacterial fermentation *in vivo* of mixed diets containing various soya bean products. *Anim Feed Sci Technol* **16**: 51-62.
- Harmon D.L., and Richards C.J. (1997) Considerations for gastrointestinal cannulations in ruminants. *J Anim Sci* **75**: 2248-2255.
- Hobson P.N., and Stewart C.S. (1997) The rumen microbial ecosystem. 2<sup>nd</sup> ed. London: Blackie Academic and Professional.
- Hongoh Y., Deevong P., Inoue T., Moriya S., Trakulnaleamsai S., Ohkuma M., Vongkaluang C., Noparatnaraporn N., and Kudo T. (2005) Intra- and Interspecific comparisons of bacterial diversity and community structure support coevolution of gut microbiota and termite host. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6590-6599.
- Kent A.D., Smith D.J., Benson B.J., and Triplett E.W. (2003) Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities. *Appl and Environ Microbiol* **69**: 6768-6776.
- Legendre P., and Legendre L. (1998) Numerical ecology, 2nd English edn. Elsevier, Amsterdam.
- Liu W.T., Marsh T.L., Cheng H., and Forney L.J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16rRNA. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4516-4522.

- Loor J.J., Hoover W.H., Miller-Webster T.K., Herbein J.H., and Polan C.E. (2003) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids in continuous culture fermenters during digestion of orchardgrass or red clover with three levels of ground corn supplementation. *J Anim Sci* **81**: 1611-1627.
- McDougall E.I. (1948) Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem J* **43**: 99-109.
- McSweeney C.S., and Denman S.E. (2007) Effect of sulfur supplements on cellulolytic rumen micro-organisms and microbial protein synthesis in cattle fed a high fibre diet. *J Appl Microbiol* **103**: 1757-1765.
- Mansfield H.R., Endres M.I., and 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.
- Marsh T.L. (1999) Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr Opin Microbiol* **2**: 323-327.
- Marsh T.L., Saxman P., Cole J., and Tiedje J. (2000) Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3616-3620.
- Martín-Orúe S.M., Balcells J., Zakraoui F., and 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.
- Miettinen H., and Setälä J. (1989) Design and development of a continuous culture system to study rumen fermentation. *J Agric Sci Finland* **61**: 463–473.
- Molina-Alcaide E., Moumen A., Martin-Garcia I., and Carro 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* DOI: 10.1111/j.1439-0396.2008.00834.
- Molina-Alcaide E., Pascual M. R., Cantalapiedra-Hijar G., Morales-García E. Y., and Martín-García A. I. (2009). Effects of concentrate replacement by feed blocks on ruminal fermentation and microbial growth in goats and single-flow continuous-culture fermenters. *J Anim Sci* **87**: 1321-1333..

- 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. PhD Diss. University of Granada. Spain.
- Muetzel, S., Lawrence P., Hoffmann E. M., and Becker K. (2009) Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. *Anim Feed Sci Technol* DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2008.11.001.
- Oltjen J.W., and Beckett J.L. (1996) Role of ruminant livestock in sustainable agricultural systems. *J Anim Sci* **74**: 1406-1409.
- Osborn A.M., Moore E.R.B., and Timmis K.N. (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol* **2**: 39-50.
- Ozutsumi Y., Tajima K., Takenaka A., and Itabashi H. (2005) The effect of protozoa on the composition of rumen bacteria in cattle using 16S rRNA gene clone libraries. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 499-506.
- Pérez J.F., Balcells J., Guada J.A., and Castrillo C. (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. *Br J Nutr* **75**: 699-709.
- Prieto, C., Aguilera J. F., Lara L., and Fonollá J. (1990) Protein and energy requirements for maintenance of indigenous Granadina goats. *Br J Nutr* **63**: 155–163.
- Rodríguez C.A., Gonzalez J., Alvir M.R., Repetto J.L., Centeno C., and Lamrani F. (2000) Composition of bacteria harvested from the liquid and solid fractions of the rumen of sheep as influenced by feed intake. *Br J Nutr* **84**: 369-376.
- Rodríguez-Prado M., Calsamiglia S., and Ferret A. (2004) Effects of fiber content and particle size of forage on the flow of microbial amino acids from continuous culture fermenters. *J Dairy Sci* **87**: 1413–1424.
- Rotger A., Ferret A., Calsamiglia S., and 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.
- Russel W.M.S., and Burch R.L., (1959) The principles of humane experimental technique. London, Methuen & Co Ltd, UK.

- Sadet S., Martin C., Meunier B., and Morgavi D.P. (2007) PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* **1**: 939-944.
- Shannon C.E., and Weaver W. (1963) The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana, USA.
- Sharp R., Ziemer C.J., Stern M.D., and Stahl D.A. (1998) Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a rumen model system. *FEMS Microbiol Ecol* **26**: 71-78.
- Slyter L.L., and Putnam P.A. (1967) *In vivo* vs. *in vitro* continuous culture of ruminal microbial populations. *J Anim Sci* **26**: 1421-1427.
- Strobel E., Seeling K., and Tebbe C.C. (2008) Diversity response of rumen microbial communities to Fusarium-contaminated feed, evaluated with rumen simulating technology. *Environ Microbiol* **10**: 483-496.
- Tajima K., Aminov R.I., Nagamine T., Ogata K., Nakamura M., Matsui H., and Benno Y. (1999) Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiol Ecol* **29**: 159-169.
- Tilley J.M.A., and Terry R.A. (1963) A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J Br Grassl Soc* **18**: 104–111.
- 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.
- Whitford M.F., Robert J.F., Beard C.E., Gong J., and Teather R.M. (1998) Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe* **4**: 153-163.
- Warner A.C.I. (1956) Criteria for establishing the validity of *in vitro* studies with rumen micro-organisms in so-called artificial rumen systems. *J Gen Microbiol* **14**: 733-748.
- Ziemer C.J., Sharp R., Stern M.D., Cotta A., Whitehead T.R., and Stahl DA (2000) Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S ribosomal RNA-targeted probes. *Environ Microbiol* **2**: 632-643.



## **CAPÍTULO 5**

### **Discusión**



El objetivo general de este trabajo de Tesis Doctoral es, como ya se ha comentado, realizar una comparación directa de la fermentación ruminal y de las comunidades bacterianas presentes en el rumen de caprino y en fermentadores de flujo continuo simple. Dado que se han utilizado dietas con distintas proporciones forraje:concentrado, también se evalúa el efecto de la reducción de la cantidad de concentrado.

La discusión se ha dividido, en función de ese doble objetivo, en dos apartados.

### **5.1. Potencial de los fermentadores para simular la fermentación ruminal del ganado caprino**

El potencial que los fermentadores de flujo continuo (FFC) poseen para reproducir y simular la fermentación ruminal se ha evaluado de diferentes formas. Algunos autores (Slyter *et al.*, 1964; Abe y Kumeno, 1973; Crawford *et al.*, 1980; Teather y Sauer, 1988; Miettinen y Setälä, 1989; Rodríguez-Prado *et al.*, 2004; Bach *et al.*, 2008) han llevado a cabo una **comparación indirecta** entre ciertos parámetros obtenidos *in vitro* y en el rumen de animales sometidos a tratamientos similares. Ello ha permitido obtener información acerca de qué aspectos de la fermentación ruminal pueden simularse en fermentadores, en determinadas condiciones experimentales. Otros autores (Slyter y Putnam, 1967; Hannah *et al.*, 1986; Mansfield *et al.*, 1995; Ziemer *et al.*, 2000; Muetzel *et al.*, 2008; Carro *et al.*, 2009) han llevado a cabo una **comparación directa**. Entre quienes realizan una comparación directa algunos (Slyter y Putnam, 1967; Mansfield *et al.*, 1995; Ziemer *et al.*, 2000; Muetzel *et al.*, 2009) han estudiado las comunidades microbianas bajo la premisa de que una adecuada simulación de la fermentación ruminal en sistemas *in vitro* implica, ineludiblemente, el asentamiento y desarrollo de comunidades microbianas similares, en composición y tamaño (Warner *et al.*, 1956), a las existentes en el rumen.

Independientemente de que la comparación haya sido directa o indirecta la validación de los sistemas *in vitro* se ha realizado atendiendo a dos criterios: **comparación numérica** (Hoover *et al.*, 1989; Karunanandaa y Varga, 1996; Moumen *et al.*, 2008) ó, más comúnmente, comparación **estadística** (Hannah *et al.*, 1986; Ziemer *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2004; Muetzel *et al.*, 2009) de los



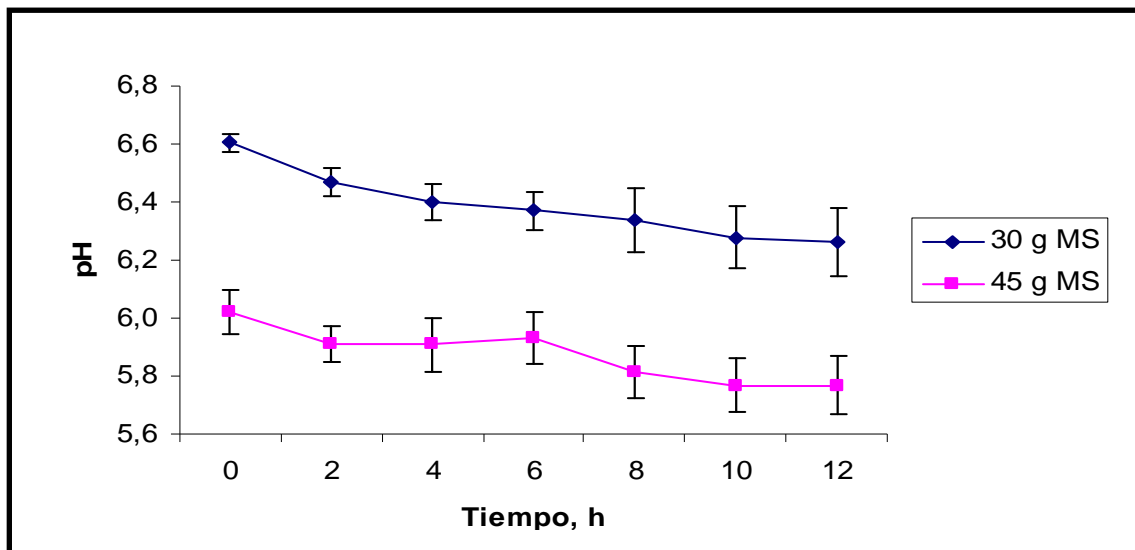
valores, generalmente expresados como concentraciones o proporciones, obtenidos en fermentadores y en rumen. No obstante, la información disponible apunta a que la relación entre las cantidades de alimento suministradas al fermentador y de saliva infundida puede producir diferencias en los resultados. Czerkawski y Bredenrickge (1977) encontraron que si bien la comparación *in vivo-in vitro* está limitada por las razones apuntadas, los sistemas de simulación *in vitro* constituyen una herramienta muy útil cuando las comparaciones se centran en los tratamientos ensayados dentro de un mismo experimento. Es por ello, que algunos trabajos de comparación directa (Mansfield *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2004; Rotger *et al.*, 2006; Carro *et al.*, 2009) o indirecta (Shriver *et al.*, 1986; Rodríguez-Prado *et al.*, 2004; Castillejos *et al.*, 2005) se han centrado en conocer si los efectos de un tratamiento sobre la fermentación en el rumen se manifiestan de manera similar en los fermentadores e incluso, si el ordenamiento o patrón de respuesta es parecido (Mansfield *et al.*, 1995). Esta última forma de enfocar el análisis, en general la más utilizada, permite comparar ambos sistemas independientemente de las diferencias numéricas o estadísticas entre los valores encontrados en el rumen y en los fermentadores.

La cantidad de alimento utilizada en ensayos con fermentadores es muy variable, encontrándose valores que oscilan entre 10,5 g (Muetzel *et al.*, 2008) y 162 g (Crawford *et al.*, 1980) de materia seca por día y litro de volumen efectivo del fermentador. En general se establece una relación cantidad de alimento/cantidad de saliva que permita promover valores de pH adecuados para los propósitos de cada estudio en particular y en función de aspectos como las características de los ingredientes de la dieta y el tiempo de retención de sólidos. Los sistemas de flujo continuo doble utilizan, en general, mayores cantidades de dieta y de saliva artificial, en relación al volumen efectivo del fermentador, que los de flujo continuo simple. Ello se debe a la mayor capacidad que tienen los primeros para evacuar los productos finales de la fermentación (tasa de dilución de líquidos elevada), sin comprometer el tiempo de retención de sólidos (tasa de dilución de sólidos baja), situación que no puede reproducirse en fermentadores de flujo simple. Esta observación se apoya en las menores concentraciones de AGV encontradas en los FFCD (Han *et al.*, 2002; Griswold *et al.*, 2003; Busquet *et al.*, 2005; Castillejos *et al.*, 2005)

con respecto a los FFCS (Dahlberg *et al.*, 1988; Bach *et al.*, 1999; Meng *et al.*, 1999; Tapia *et al.*, 2002; Moumen *et al.*, 2008) cuando en ambos se emplean cantidades similares de dieta.

Dadas las diferencias constatadas en algunos parámetros de la fermentación ruminal entre distintas especies de rumiantes (Prigge *et al.*, 1984; Reid *et al.*, 1990), así como las diferencias técnicas encontradas entre los distintos modelos de fermentadores para simular la fermentación ruminal (Dahlberg *et al.*, 1988; Carro *et al.*, 2009) parece razonable cuestionar la validez de extrapolar los resultados obtenidos en comparaciones directas FFCD – rumen de ganado vacuno (Hannah *et al.*, 1986; Mansfield *et al.*, 1995) a una situación en la que se utilicen los FFCS como simuladores de la fermentación ruminal del ganado caprino. En el presente trabajo se han utilizado cabras alimentadas con distintas dietas, cuyo contenido ruminal se utilizó para inocular los fermentadores sometidos a los mismos tratamientos. Sin embargo, el análisis comparativo se ha abordado de dos formas distintas: **comparación estadística** de los valores obtenidos (**publicación 1**) y **comparación de los efectos** de los tratamientos y análisis del patrón de respuesta a los tratamientos en ambos sistemas (**publicaciones 1 y 3**). Dada la variabilidad en la cantidad de alimento empleada en los fermentadores y su repercusión en el pH, en el ensayo *in vitro* del exp. 2 se utilizaron dos cantidades de dieta diferentes (30 y 45 g MS/fermentador/día, equivalentes a, aproximadamente, 23,5 y 35 g MS/l de saliva infundida), con objeto de conocer su influencia sobre la simulación de los efectos estudiados. Como se aprecia en la **Figura 5.1** la evolución del pH es similar para el conjunto de dietas con ambas cantidades de alimento aunque el valor medio del pH es distinto ( $P < 0,001$ ).

El pH es una variable que, a priori, se puede controlar en los ensayos *in vitro* al igual que la temperatura, la anaerobiosis y las tasas de dilución, de forma que las condiciones de fermentación sean lo mas representativas posible de las existentes en el rumen. Sin embargo, la manipulación del pH puede realizarse en base a diferentes criterios. Algunos autores (Dahlberg *et al.*, 1988; Mansfield *et al.*, 1995; Rodriguez-Prado *et al.*, 2004; Castillejos *et al.*, 2005) han establecido un pH constante, con objeto de normalizar las condiciones para los distintos tratamientos estudiados.



**Figura 5.1.** Evolución temporal del pH en fermentadores de flujo continuo simple alimentados con dos cantidades distintas de las dietas experimentales

Ello ha permitido establecer en qué medida la respuesta al tratamiento está determinada por el tipo de alimento y no por el pH (Calsamiglia *et al.*, 2008). En otros trabajos (Miettinen y Setälä, 1989; Bach *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2004; Bach *et al.*, 2009) el pH se mantiene dentro de un rango de valores determinado, fuera del cual se considera que ciertos parámetros de la fermentación ruminal se ven perjudicados. También existen trabajos (Loor *et al.*, 2003; Soder *et al.*, 2007; Muetzel *et al.*, 2009; Wales *et al.*, 2009) en los que no se establece control sobre el pH, dejando que la capacidad tampón de la saliva artificial y la degradabilidad de los substratos aportados al fermentador sean los factores que determinen las oscilaciones del pH. Por último, existen algunos estudios cuyo objetivo principal ha sido precisamente comprobar el efecto del pH sobre determinados parámetros de la fermentación ruminal. Para ello, se han establecido oscilaciones del pH (Calsamiglia *et al.*, 2002; Colombatto *et al.*, 2003; Cerrato-Sánchez *et al.*, 2008; Wales *et al.*, 2009) o valores fijos del mismo (Hoover *et al.*, 1984; Shriver *et al.*, 1986; de Veth y Kolver, 2001).

En numerosos estudios se ha señalado que las limitaciones de los FFC, tanto simple como doble, para reproducir ciertos parámetros de la fermentación ruminal derivan, en su gran mayoría, de las diferencias que se establecen respecto a condiciones *in vivo* en cuanto al pH medio o en su evolución

postprandial (Bach *et al.*, 1999; Rodríguez-Prado *et al.*, 2004; Castillejos *et al.*, 2005; Carro *et al.*, 2009). A pesar de la importancia que el pH tiene para la simulación *in vitro* de los parámetros de la fermentación ruminal, ninguna de las comparaciones directas abordadas (Hannah *et al.*, 1986; Mansfield *et al.*, 1995; Muetzel *et al.*, 2008; Carro *et al.*, 2009) ha simulado la cinética que sigue el pH *in vivo*, probablemente por la complejidad que conlleva. En los experimentos *in vitro*, que se presentan en esta memoria, la evolución temporal del pH es la derivada de la fermentación de la dieta experimental considerada y del aporte continuo de saliva artificial. A pesar de que la infusión constante de saliva pudiera dar lugar a valores del pH y promover una evolución del mismo diferentes de lo que ocurre en el rumen, la comparación estadística *in vivo* - *in vitro* (**publicación 3**) muestra que las oscilaciones de los valores de pH en el sistema *in vitro*, a lo largo del tiempo, fueron similares al pH ruminal cuando se administraron altas cantidades de MS (45 g/día) al fermentador, pero no cuando el aporte de MS fue menor (30 g/día), probablemente por representar una relación dieta/saliva artificial menor y estar más influenciado por la capacidad tampón de esta última.

Los resultados obtenidos en el exp. 1 (**publicación 1**), en relación al pH, muestran que ni la comparación estadística de los valores absolutos ni la ordenación de los tratamientos eran similares en los FFCS y en el rumen, en consonancia con lo observado al comparar resultados obtenidos *in vivo* (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2004) e *in vitro* (Moumen *et al.*, 2008), utilizando las mismas dietas. Sin embargo, el que la respuesta a los tratamientos sea diferente en fermentadores y en el rumen parece deberse, fundamentalmente, a la distinta tendencia encontrada para la dieta ACBII en el rumen y en los FFCS. Probablemente la degradación del bloque II es más lenta que la del bloque I y que la del concentrado aunque la producción media de AGV indica una extensión de la degradación similar con las tres dietas ensayadas. Una mayor ingesta de la dieta ACBII (9 y 11% mayor en comparación con las dietas AC y ACBI, respectivamente) pudo compensar la menor velocidad de degradación *in vivo*. En el exp. 2 (**publicación 3**) se observó que la relación dieta/saliva influye directamente en los valores de pH alcanzados en los fermentadores, quedando patente que en nuestras condiciones experimentales una relación de 23 g MS/l de saliva da lugar a valores de pH medios para las 4 dietas estudiadas (6,22 –

6,53) mas próximos a los encontrados en el rumen (6,21 – 6,43) que cuando la relación se aproxima a 35 g MS/l de saliva, que promueve valores de pH comprendidos entre 5,70 y 6,08.

En los exp. 1 y 2 (**publicaciones 1 y 3**) los efectos de los tratamientos estudiados sobre la concentración de AGV promovieron un patrón de respuesta similar al encontrado en el rumen de los animales. En el exp. 1, además, los valores absolutos resultaron cercanos a los obtenidos en el rumen, lo que indicaría que la cantidad de dieta administrada al fermentador (75 g MS/fermentador y día) fue adecuada. En comparaciones directas se ha descrito una mayor concentración de AGV en fermentadores que en el rumen (Hannah *et al.*, 1986; Mansfield *et al.*, 1995; Ziemer *et al.*, 2000; Devant *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004; Rotger *et al.*, 2006) lo que se ha atribuido a la ausencia de absorción de los productos de la fermentación en los sistemas *in vitro*. No obstante, también se encuentran trabajos de comparación directa en los que la concentración de AGV en fermentadores es similar (Carro *et al.*, 2009) ó menor (Muetzel *et al.*, 2009) que en el rumen, lo que puede suponer que el valor obtenido *in vitro* depende, fundamentalmente, de la relación dieta/saliva empleada.

Si en el exp. 1 la concentración de AGV, en fermentadores y en el rumen, no fue comparable porque los valores medios correspondían a rangos de tiempo distintos, en el exp. 2 la concentración media de AGV en rumen y FFCS se midió en el mismo rango de tiempo (0-12 horas tras la administración de la dieta). En este caso (**publicaciones 2 y 3**) los efectos de los tratamientos estudiados se reprodujeron adecuadamente cuando los FFCS presentaron un rango de pH similar al del rumen (aportes de 30 g MS diarios al fermentador). Sin embargo, cuando los FFCS recibieron 45 g de MS diarios la simulación del efecto del nivel del concentrado no fue adecuada, en consonancia con los resultados de Carro *et al.* (2009). Estos autores ofrecían a los FFCS 30 g MS/l saliva, valor intermedio de los empleados en el presente estudio (23,5 y 35 g MS/l saliva), que promovían valores de pH *in vitro* e *in vivo* sensiblemente diferentes.

Un aspecto importante de la simulación *in vitro*, en cuanto a la concentración de AGV en el rumen, es que en los fermentadores se consiga no solo una respuesta a los tratamientos similar a la que se produce en el rumen

en el valor medio sino que también la evolución temporal sea similar, lo que indicaría que los sustratos tienen una cinética de degradación parecida en fermentadores y en el rumen. Los resultados que se presentan en la **publicación 3** indican que la concentración de los dos productos principales de la fermentación ruminal (AGV y amoniaco) evolucionaron de forma similar en el rumen y en los FFCS utilizados, independientemente de la cantidad de dieta suministrada, lo que contrasta con los resultados de Carro *et al.* (2009). La mayor parte de los trabajos que realizan comparaciones directas *in vivo-in vitro* reflejan discrepancias no solo en cuanto a los valores absolutos de AGV individuales (Hannah *et al.*, 1985; Mansfield *et al.*, 1995; Ziemer *et al.*, 2000) sino también en las respuestas a los diferentes tratamientos (Devant *et al.*, 2001; Rotger *et al.*, 2006; Carro *et al.*, 2009). Los datos de los exp. 1 y 2 (**publicaciones 1, 2 y 3**) muestran diferencias en cuanto a los valores absolutos de las proporciones molares de prácticamente todos los AGV individuales en FFCS y en el rumen de caprino. Además, en ambos ensayos *in vitro* los valores de ácido acético y propiónico presentaron la misma tendencia: menor proporción de acético y mayor de propiónico que en el rumen, independientemente de que el pH de los fermentadores y del rumen fueran o no similares. Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas por algunos autores (Ziemer *et al.*, 2000; Devant *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Rotger *et al.*, 2006) aunque discrepan de las de otros (Hannah *et al.*, 1986; Mansfield *et al.*, 1995; Muetzel *et al.*, 2009). En FFCD se ha demostrado la existencia de una relación entre las proporciones molares de acético y propiónico y los valores de pH (Shriver *et al.*, 1986; de Veth y Kolver, 2001; Calsamiglia *et al.*, 2008). Sin embargo, en nuestras condiciones, las discrepancias *in vivo - in vitro* no pueden deberse únicamente al pH, ya que las diferencias fueron evidentes aún cuando los valores del pH *in vitro* (fermentadores alimentados con 30 g de dieta al día) estaban próximos a los encontrados en el rumen. Por otro lado, se ha demostrado tanto en FFCS (Meng *et al.*, 1999) como en FFCD (Crawford *et al.*, 1980) que las tasas de dilución afectan a las proporciones molares de los AGV, no quedando claro si tales efectos se ejercen a través del pH o no. Las diferencias *in vivo - in vitro* en las proporciones molares de los AGV individuales podrían explicarse en función de cambios en las especies microbianas presentes en fermentadores y

en el rumen (Carro *et al.*, 2009). Esta hipótesis parece confirmarse en los experimentos que incluye esta memoria ya que se ha constatado, mediante técnicas moleculares, la diferente estructura de esas comunidades bacterianas **(publicaciones 4 y 5)**. La ausencia o disminución de protozoos en los FFC, con respecto al rumen, ha sido descrita por diversos autores (Slyter y Putnam, 1967; Hannah *et al.*, 1986; Mansfield *et al.*, 1995; Moumen *et al.*, 2008) y parece que afecta en mayor medida a los fermentadores de flujo simple que a los de flujo doble (Hoover *et al.*, 1976). Entre las causas que motivan la ausencia o disminución de protozoos en fermentadores de flujo continuo destacan las tasas de dilución (Abe y Kumeno, 1973; Hoover *et al.*, 1976; Meng *et al.*, 1999), el tiempo de retención de sólidos (Crawford *et al.*, 1980; Fuchigami *et al.*, 1989; Teather y Sauer, 1988) y el pH (Slyter y Putnam, 1967), conceptos íntimamente relacionados en el caso de los FFCS (Meng *et al.*, 1999). En nuestros ensayos *in vitro* de ambos experimentos no se realizó recuento de protozoos, puesto que se conocía (Moumen, 2003; Moumen *et al.*, 2008) que en el modelo de fermentadores utilizados se produce una disminución progresiva del número de protozoos y su práctica desaparición transcurrido 7 días. Comparando animales faunados y defaunados alimentados con la misma dieta (Jouany *et al.*, 1979; Ushida *et al.*, 1986; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2007; Belanche *et al.*, 2009) y FFCS con o sin población protozoaria (Fuchigami *et al.*, 1989) se han encontrado diferencias en las proporciones molares de AGV. Aunque la disminución o ausencia de protozoos tiene respuestas muy variables (Jouany *et al.*, 1988), son varios los autores que observan un incremento en la proporción de ácido propiónico (Demeyer *et al.*, 1981; Whitelaw *et al.*, 1984) a expensas del ácido acético, como ha ocurrido en los trabajos *in vitro* del presente trabajo. El que el perfil de AGV en el rumen cambie o no en presencia o ausencia de protozoos puede deberse a la fermentación acética y butírica, característica de los protozoos ruminales (Jouany *et al.*, 1988) o incluso a las modificaciones de las comunidades microbianas (Ozutsumi *et al.*, 2005; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2007; Belanche *et al.*, 2009) que su ausencia determina. A pesar de las diferencias numéricas encontradas cuando se comparan los fermentadores con el rumen de caprino, en cuanto a las proporciones de los AGV, la ordenación de los tratamientos no era muy distinta. La única excepción correspondió a las proporciones de ácidos

propiónico y butírico para la dieta ACBII, que diferían de las del resto de las dietas, muy probablemente debido a diferencias en el pH, con un valor medio de 6,29 para esa dieta y de 5,96 y 5,78 para las dietas AC y ACBI, respectivamente. En el exp. 2 (**publicación 3**) la simulación del efecto de la cantidad de concentrado en la dieta con los fermentadores fue adecuada con respecto a las proporciones de los ácidos acético y propiónico así como de la relación acético/propiónico, independientemente del pH, y, con respecto al ácido butírico, solamente se observó una simulación adecuada cuando el pH era bajo. Estos resultados están en consonancia con las observaciones realizadas en el estudio comparativo de Carro *et al.* (2009). Sin embargo, el efecto del tipo de forraje no se simuló bien prácticamente en ninguno de los AGV estudiados, probablemente debido a una peor simulación de la fermentación de las dietas ricas en forraje (GF y AF), cuyas relaciones acético/propiónico no respondieron de la misma forma que lo hacían *in vivo*. La fermentación de ambas dietas promovía en el rumen de caprino valores similares de la relación acético/propiónico.

La concentración de N amoniacal fue, en general, menor en los FFCS que en el rumen de caprino (**publicaciones 1, 2 y 3**), en contra de las observaciones realizadas por otros autores (Hannah *et al.*, 1986), aunque en el exp. 2 la concentración de N amoniacal dependía de la calidad de la dieta considerada, siendo los valores más bajos en fermentadores que en rumen sólo con las dietas basadas en heno de gramíneas. La concentración de N-amoniacal mínima para asegurar un crecimiento microbiano óptimo es variable, habiéndose establecido en 2,5 mg/dl (Owen y Bergen, 1983), 5 mg/dl (Satter y Slyter, 1974) o entre 3,3 y 8,5 mg/dl (Kang-Meznarich y Broderick, 1981). Los valores obtenidos *in vitro* en el exp. 1 rozaban o estaban por debajo de esas cifras mientras que en el exp. 2 sólo la dieta GF producía valores inferiores a los referidos anteriormente. En nuestras condiciones *in vitro*, el reciclado de urea que tiene lugar en el rumen, especialmente importante en el ganado caprino (Narjissé y Malechek, 1990), no se reproduce bien, y probablemente ello determine las diferencias entre fermentadores y rumen. Además, la ausencia o el descenso drástico del número de protozoos en FFC puede contribuir a la menor concentración de N-amoniacal *in vitro* en comparación con el rumen dado el importante papel que los protozoos tienen en el reciclado de



N en el rumen (Veira, 1986). Sin embargo, otros autores han encontrado concentraciones de N-amoniaco mayores en los sistemas *in vitro* (Hannah *et al.*, 1986) que en el rumen, justificando este resultado por la ausencia de absorción *in vitro* de los productos de la fermentación. Los numerosos factores que determinan el valor de este parámetro en las diferentes condiciones *in vitro* hacen de él uno de los parámetros de la fermentación ruminal menos estables y de más difícil simulación (Miettinen y Setälä, 1989; Mansfield *et al.*, 1995). A pesar de algunas diferencias encontradas en los valores de este parámetro *in vivo* – *in vitro*, la simulación de los efectos estudiados (exp. 2) y la ordenación de los tratamientos (exp. 1) fueron adecuadas.

**En general los valores de los parámetros de la fermentación ruminal estudiados en los FFCS diferían de los obtenidos en el rumen de caprino, probablemente por una inadecuada relación entre la cantidad de alimento y la de saliva en los fermentadores. Sin embargo, el patrón de respuesta a los tratamientos ensayados era, en muchas ocasiones, similar al del rumen, lo que indica un cierto potencial de los FFCS para simular la fermentación que tiene lugar en el rumen de caprino. El pH en los fermentadores es un aspecto esencial para conseguir una simulación adecuada. La calidad del forraje puede influir en el grado de simulación que se obtenga.**

#### **5.1.1. Composición química de las fracciones bacterianas y síntesis de proteína microbiana**

Para poder discutir en profundidad este apartado se presentan, a continuación, dos tablas que resumen los resultados obtenidos en ambos experimentos, en relación al flujo de N microbiano (FNM), estimado a partir de la excreción de DP en la orina de los animales o del flujo de BP en los efluentes de los fermentadores y de la relación BP:N analizada en diferentes fracciones bacterianas (**Tablas 5.1 y 5.2**).

La fracción bacteriana, más comúnmente empleada para la estimación del flujo de N microbiano, es la que se aísla a partir del componente líquido del contenido ruminal (bacterias asociadas a líquido; BAL).

**Tabla 5.1.** Valores medios del flujo de N microbiano en el rumen de caprino y en fermentadores de flujo continuo simple (experimento 1), estimados utilizando la relación BP/N de diferentes fracciones bacterianas.

|   | Dietas <sup>1</sup> |                     |                    | EEM <sup>2</sup> | P-valor |
|---|---------------------|---------------------|--------------------|------------------|---------|
|   | AC                  | ACBI                | ACBII              |                  |         |
| <b>Rumen</b>                              |                     |                     |                    |                  |         |
| pH medio                                  | 6,35                | 6,45                | 6,51               | 0,030            | 0,10    |
| Excreción urinaria de DP, mmol/d          | 6,75 <sup>a</sup>   | 5,60 <sup>ab</sup>  | 4,54 <sup>b</sup>  | 0,22             | 0,02    |
| Flujo BP al duodeno <sup>3</sup> , mmol/d | 9,65 <sup>a</sup>   | 8,01 <sup>ab</sup>  | 6,49 <sup>b</sup>  | 0,27             | 0,04    |
| BP:N, µmol/mg                             |                     |                     |                    |                  |         |
| BAL                                       | 0,66                | 0,92                | 0,75               | 0,10             | 0,23    |
| BAS                                       | 0,50 <sup>b</sup>   | 0,71 <sup>a</sup>   | 0,59 <sup>ab</sup> | 0,04             | 0,01    |
| Media de BAL y BAS                        | 0,58 <sup>b</sup>   | 0,82 <sup>a</sup>   | 0,67 <sup>ab</sup> | 0,06             | 0,03    |
| Flujo N microbiano, g/d                   |                     |                     |                    |                  |         |
| BAL                                       | 14,5                | 8,74                | 8,65               | 2,4              | 0,23    |
| BAS                                       | 19,4 <sup>a</sup>   | 11,3 <sup>b</sup>   | 10,9 <sup>b</sup>  | 1,6              | 0,004   |
| Media de BAL y BAS                        | 17,0 <sup>a</sup>   | 9,8 <sup>b</sup>    | 11,3 <sup>b</sup>  | 1,1              | 0,001   |
| <b>Fermentador</b>                        |                     |                     |                    |                  |         |
| pH medio                                  | 5,96 <sup>b</sup>   | 5,78 <sup>b</sup>   | 6,29 <sup>a</sup>  | 0,038            | <0,001  |
| Flujo BP, µmol/d                          | 862 <sup>b</sup>    | 1.029 <sup>ab</sup> | 1.206 <sup>a</sup> | 36               | 0,01    |
| BP:N, µmol/mg                             |                     |                     |                    |                  |         |
| BAL                                       | 0,89 <sup>b</sup>   | 1,19 <sup>a</sup>   | 1,02 <sup>ab</sup> | 0,08             | 0,04    |
| BAS                                       | 0,60 <sup>c</sup>   | 0,79 <sup>a</sup>   | 0,69 <sup>b</sup>  | 0,02             | <0,001  |
| BE  | 1,08 <sup>a</sup>   | 1,26 <sup>b</sup>   | 1,05 <sup>a</sup>  | 0,04             | 0,002   |
| Media de BAL y BAS                        | 0,74 <sup>b</sup>   | 0,99 <sup>a</sup>   | 0,86 <sup>ab</sup> | 0,04             | 0,002   |
| Flujo N microbiano, mg/d                  |                     |                     |                    |                  |         |
| BAL                                       | 1.026 <sup>a</sup>  | 863 <sup>b</sup>    | 1.181 <sup>a</sup> | 34               | 0,03    |
| BAS                                       | 1.423 <sup>ab</sup> | 1.274 <sup>b</sup>  | 1.711 <sup>a</sup> | 97               | 0,01    |
| BE  | 783 <sup>b</sup>    | 795 <sup>b</sup>    | 1.135 <sup>a</sup> | 48               | <0,001  |
| Media de BAL y BAS                        | 1.171 <sup>ab</sup> | 1.020 <sup>b</sup>  | 1.392 <sup>a</sup> | 64               | 0,04    |

<sup>1</sup> AC = 60% heno de alfalfa + 40% concentrado; ACBI = 60% heno de alfalfa + 20% concentrado + 20% bloque I; ACBII = 60% heno de alfalfa + 20% concentrado + bloque II

<sup>2</sup> EEM = error estándar de la media

<sup>3</sup> Flujo BP al duodeno = Excreción de DP en orina/0,76\*0,92 (Belenguer *et al.*, 2002)

Las bacterias asociadas al componente sólido (BAS) son predominantes en el contenido del rumen (Craig *et al.*, 1987) aunque su proporción relativa en el duodeno varía ampliamente (Carro y Miller, 2002; Rodríguez *et al.*, 2003). La comparación de ambas como fracción de referencia en la estimación del flujo de N microbiano es de gran interés.

En los experimentos 1 y 2 se aislaron las fracciones BAL y BAS a partir del contenido del rumen de caprino. En los fermentadores, además de esas

dos fracciones bacterianas, que se aislaron a partir del contenido del vaso del fermentador, se han aislado las bacterias del efluente (BE), cuya utilización para la estimación del FNM se ha sugerido (Molina-Alcaide *et al.*, 2008) que es más fiable que la realizada a partir de las bacterias aisladas del contenido del vaso del fermentador, al representar el conjunto de bacterias totales que realmente abandona el rumen.

Existen evidencias de que la composición de las bacterias está influida por cambios en el ambiente (Martín *et al.*, 1994; Martín-Orúe *et al.*, 1998), que probablemente repercuten en los factores de crecimiento requeridos por esas bacterias (Bates *et al.*, 1985; Craig *et al.*, 1987). Una comparación rumen - FFCS debería permitir evaluar la idoneidad del ambiente que existe en el vaso de fermentación para el asentamiento de comunidades bacterianas similares a las que existen en el rumen. En la mayoría de los trabajos se ha observado un menor contenido en bases púricas y menor relación BP/N en BAS que en BAL y ello, tanto *in vivo* (Cecava *et al.*, 1990; Pérez *et al.*, 1998; Martín-Orúe *et al.*, 1998; Dewhurst *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2000) como *in vitro* (Carro y Miller, 2002; Rodríguez-Prado *et al.*, 2004; Vlaeminck *et al.*, 2007; Molina-Alcaide *et al.*, 2008).

Los resultados de nuestros experimentos (**publicaciones 1 y 3**) confirman esas observaciones, aunque las diferencias *in vivo* sólo fueron significativas en el exp. 1 ( $P < 0,001$ ). El menor contenido en BP en las BAS, con respecto a las BAL, se ha atribuido a la presencia de especies distintas y a un menor ritmo de crecimiento de las bacterias que integran la fracción de BAS (Obispo y Dehority, 1999; Carro y Miller, 2002). Algunos autores han demostrado que la dieta puede influir tanto en la composición química de las bacterias ruminales (Hvelplund, 1986; Rodríguez *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001) como en la proporción de BAL y BAS en la digesta (Yang *et al.*, 2001). Sin embargo, la información relativa al efecto de la dieta sobre la concentración del marcador microbiano en la fracción bacteriana aislada es contradictoria (Martín-Orúe *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2000; Molina-Alcaide *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en los dos experimentos realizados en este trabajo son igualmente contradictorios, existiendo un efecto de la dieta sobre la relación BP:N en algunas de las fracciones bacterianas aisladas pero no así en otras. Además,

este efecto se manifiesta de forma diferente *in vivo* e *in vitro* según la fracción bacteriana considerada.

**Tabla 5.2.** Valores medios del flujo de N microbiano en el rumen de caprino y en fermentadores de flujo continuo simple (experimento 2), estimados utilizando la relación BP/N de diferentes fracciones bacterianas.

|  | Dietas <sup>1</sup> |                   |                    |                    | EEM <sup>2</sup> | P-valor |
|--|---------------------|-------------------|--------------------|--------------------|------------------|---------|
|  | GF                  | AF                | GC                 | AC                 |                  |         |
| <b>Rumen</b>                           |                     |                   |                    |                    |                  |         |
| pH medio                               | 6,43                | 6,43              | 6,21               | 6,26               | 0,055            | 0,08    |
| Excreción DP orina, mmol/d             | 8,40 <sup>b</sup>   | 13,8 <sup>a</sup> | 11,5 <sup>a</sup>  | 14,3 <sup>a</sup>  | 0,33             | <0,001  |
| Flujo BP duodeno <sup>3</sup> , mmol/d | 11,1 <sup>b</sup>   | 18,2 <sup>a</sup> | 15,2 <sup>a</sup>  | 18,8 <sup>a</sup>  | 0,48             | <0,001  |
| BP:N, µmol/mg                          |                     |                   |                    |                    |                  |         |
| BAL                                    | 0,98                | 1,10              | 1,12               | 0,89               | 0,062            | 0,31    |
| BAS                                    | 0,72                | 1,16              | 1,14               | 0,71               | 0,083            | 0,59    |
| Media de BAL y BAS                     | 0,85                | 1,13              | 1,13               | 0,80               | 0,061            | 0,24    |
| Flujo N microbiano, g/d                |                     |                   |                    |                    |                  |         |
| BAL                                    | 12,1 <sup>c</sup>   | 18,1 <sup>b</sup> | 14,7 <sup>bc</sup> | 23,1 <sup>a</sup>  | 0,45             | <0,001  |
| BAS                                    | 16,3 <sup>b</sup>   | 17,0 <sup>b</sup> | 14,4 <sup>b</sup>  | 28,9 <sup>a</sup>  | 0,63             | <0,001  |
| Media de BAL y BAS                     | 13,9 <sup>b</sup>   | 17,5 <sup>b</sup> | 14,5 <sup>b</sup>  | 25,6 <sup>a</sup>  | 0,60             | <0,001  |
| <b>Fermentador</b>                     |                     |                   |                    |                    |                  |         |
| pH medio                               |                     |                   |                    |                    |                  |         |
| 30 g MS                                | 6,50 <sup>a</sup>   | 6,53 <sup>a</sup> | 6,22 <sup>b</sup>  | 6,31 <sup>b</sup>  | 0,018            | 0,01    |
| 45 g MS                                | 6,08 <sup>a</sup>   | 5,79 <sup>b</sup> | 5,94 <sup>c</sup>  | 5,70 <sup>d</sup>  | 0,013            | <0,001  |
| Flujo BP, µmol/d                       |                     |                   |                    |                    |                  |         |
| 30 g MS                                | 294 <sup>b</sup>    | 458 <sup>a</sup>  | 478 <sup>a</sup>   | 481 <sup>a</sup>   | 8,7              | <0,001  |
| 45 g MS                                | 415 <sup>c</sup>    | 607 <sup>b</sup>  | 703 <sup>a</sup>   | 580 <sup>b</sup>   | 13               | <0,001  |
| BP:N, µmol/mg                          |                     |                   |                    |                    |                  |         |
| BAL <sup>4</sup>                       | 1,08 <sup>a</sup>   | 0,83 <sup>b</sup> | 0,91 <sup>b</sup>  | 0,97 <sup>ab</sup> | 0,012            | 0,001   |
| BAS <sup>4</sup>                       | 0,75                | 0,82              | 0,82               | 0,77               | 0,025            | 0,71    |
| Media de BAL y BAS <sup>4</sup>        | 0,92                | 0,83              | 0,87               | 0,87               | 0,017            | 0,66    |
| BE                                     |                     |                   |                    |                    |                  |         |
| 30 g MS                                | 0,88 <sup>b</sup>   | 1,01 <sup>a</sup> | 0,97 <sup>a</sup>  | 0,92 <sup>b</sup>  | 0,043            | 0,008   |
| 45 g MS                                | 0,89 <sup>b</sup>   | 1,06 <sup>a</sup> | 1,07 <sup>a</sup>  | 0,95 <sup>b</sup>  | 0,043            | 0,002   |
| Flujo N microbiano, mg/d               |                     |                   |                    |                    |                  |         |
| BAL <sup>4</sup>                       | 384 <sup>c</sup>    | 731 <sup>a</sup>  | 773 <sup>a</sup>   | 598 <sup>b</sup>   | 24               | <0,001  |
| BAS <sup>4</sup>                       | 553 <sup>b</sup>    | 740 <sup>a</sup>  | 857 <sup>a</sup>   | 753 <sup>a</sup>   | 21               | 0,002   |
| Media de BAL y BAS <sup>4</sup>        | 451 <sup>b</sup>    | 736 <sup>a</sup>  | 808 <sup>a</sup>   | 676 <sup>ab</sup>  | 26               | 0,001   |
| BE                                     |                     |                   |                    |                    |                  |         |
| 30 g MS                                | 366 <sup>b</sup>    | 452 <sup>a</sup>  | 493 <sup>a</sup>   | 524 <sup>a</sup>   | 8,5              | <0,001  |
| 45 g MS                                | 463 <sup>b</sup>    | 570 <sup>ab</sup> | 658 <sup>a</sup>   | 609 <sup>a</sup>   | 11               | <0,001  |

<sup>1</sup> GF = 70% heno de gramíneas + 30% concentrado; AF = 70% heno de alfalfa + 30% concentrado; GC = 30% heno de gramíneas + 70% concentrado; AC = 30% heno de alfalfa + 70% concentrado

<sup>2</sup> EEM = error estándar de la media

<sup>3</sup> Flujo BP al duodeno = Excreción de DP en orina/0,76\*0,92 (Belenguer *et al.*, 2002)

<sup>4</sup> Fracciones únicamente aisladas en aquellos fermentadores que recibían 45 g MS/ día

Así, por ejemplo en los dos ensayos realizados *in vivo* (**Tablas 5.1 y 5.2**) no se detectó efecto de la dieta sobre el valor BP:N en la fracción BAL aunque si se detectaba dicho efecto en esa misma fracción, aislada a partir del contenido del fermentador. En la fracción BAS el valor BP:N se afectaba por la dieta únicamente en el exp. 1, tanto *in vivo* como *in vitro*. Un patrón diferente de respuesta a los tratamientos *in vivo* e *in vitro*, en relación a la concentración del marcador microbiano, podría ser responsable de las discrepancias encontradas en relación al flujo de N microbiano. El efecto del tipo de dieta sobre la concentración del marcador microbiano, en las diferentes fracciones bacterianas aisladas *in vitro*, hizo que los valores estimados del FNM no siguieran la misma tendencia u ordenamiento que el flujo de BP en los efluentes, en consonancia con lo observado por Moumen *et al.* (2008). Rodríguez-Prado *et al.* (2004) encontraron, en su estudio con FFCD, que las diferencias en la composición de BAL y BAS podrían contribuir a los cambios observados en las estimaciones de parámetros del metabolismo nitrogenado, más incluso que un efecto directo de la dieta sobre estos. En este sentido, cabría matizar, en nuestras condiciones experimentales, que incluso las diferencias debidas al efecto de la dieta dentro de una misma fracción bacteriana podrían suponer cambios importantes en la interpretación de los efectos estudiados. Las discrepancias *in vivo* – *in vitro*, en relación a la composición química de las fracciones bacterianas (**publicaciones 1 y 3**), son evidentes en ambos estudios y sugieren una composición en especies bacterianas distinta.

Los resultados de los experimentos 1 y 2 (**Tablas 5.1 y 5.2**) indican que los valores BP/N, en las bacterias aisladas del efluente de los fermentadores, son más cercanos a los encontrados en BAL que en BAS para todas las dietas estudiadas, en concordancia con las observaciones realizadas por Molina-Alcaide *et al.*, 2008. Ello sugiere una mayor contribución de las bacterias asociadas a líquido que de las asociadas a sólido al conjunto de bacterias que abandona el vaso de fermentación.

Zinn y Owens (1986) propusieron el uso de las BP como marcador microbiano para la estimación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen. Estos autores, al igual que los que han propuesto ecuaciones de predicción del FNM *in vivo* a partir de la excreción urinaria de DP (Chen *et al.*,

1990; Belenguer *et al.*, 2002; Mota *et al.*, 2008), utilizan un valor constante de la relación BP/N en las células bacterianas aisladas. Así, obtienen valores del FNM proporcionales a la cantidad de DP excretados en orina (*in vivo*) o al flujo de BP (*in vitro*) para los tratamientos estudiados. En trabajos realizados con FFC, en los que se han aislado fracciones bacterianas de referencia para la estimación del FNM, se han aplicado los valores individuales de la relación BP/N de las fracciones aisladas (Bach *et al.*, 1999; Castillejos *et al.*, 2005; Cerrato-Sánchez *et al.*, 2008; Moumen *et al.*, 2008). Resulta paradójico que en la práctica totalidad de los experimentos *in vivo* se mencione la concentración del marcador microbiano en las bacterias mientras que son escasos los trabajos realizados con FFC (Hannah *et al.*, 1986; de Veth y Kolver, 2001; Rodríguez-Prado *et al.*, 2004) en los que se proporciona tal dato. Este hecho dificulta la discusión de los resultados. Por otro lado, en algunos estudios en los que se ha realizado una comparación directa FFC – rumen (Devant *et al.*, 2001; Carro *et al.*, 2000, 2009) se ha utilizado un valor constante de la concentración del marcador microbiano en las bacterias para estimar el FNM *in vivo* y valores individuales de tal parámetro en las condiciones *in vitro*. La comparación entre el flujo de BP en fermentadores y la excreción urinaria de DP en los animales, probablemente, represente una forma más adecuada de validar los sistemas de simulación en este sentido que si se compara la síntesis de proteína microbiana. Mediante ensayos dosis – respuesta se ha encontrado una elevada correlación entre la cantidad de purinas infundidas en duodeno y la de DP excretados en orina en bovino (Verbic *et al.*, 1990; Vagnoni *et al.*, 1997; Orellana-Boero *et al.*, 2001; González-Ronquillo *et al.*, 2003), ovino (Chen *et al.*, 1990; Balcells *et al.*, 1991) y caprino (Belenguer *et al.*, 2002; Mota *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que la excreción de DP en orina tiene una estrecha relación con el flujo de BP al duodeno en los mismos animales (Pérez *et al.*, 1996; Martín-Orúe *et al.*, 2000). En base a ello podría especularse que una adecuada simulación *in vitro* de la fermentación ruminal debería implicar la existencia de una relación entre el flujo de BP en los efluentes y la excreción urinaria de DP en los animales. En las **Tablas 5.1 y 5.2** relativas a los exp. 1 y 2, respectivamente, se observa que el flujo de BP en los efluentes responde a los distintos tratamientos de igual forma que la excreción urinaria de DP en los animales alimentados con las mismas dietas, cuando el pH de los

fermentadores estaba dentro del rango de valores encontrados en el rumen de los animales. En este sentido, puede que también las diferencias entre los resultados encontrados *in vivo* por Yáñez-Ruiz *et al.* (2004a, b) y en FFCS alimentados con las mismas dietas por Moumen *et al.* (2008) se deban a una inadecuada simulación del pH ruminal en los FFCS. En los ensayos del exp. 1 un pH más adecuado en los fermentadores alimentados con la dieta ACBII, en comparación con aquellos que recibían las dietas AC y ACBI, pudo promover flujos mas elevados de BP y N microbiano, situación que no ocurrió *in vivo* dado que las tres dietas promovían valores similares de pH.

En FFCD de Veth y Kolver (2001) observaron que valores de pH inferiores a 5,8 disminuían el FNM. También se ha observado que el porcentaje de N no amoniacal, de origen microbiano, se reduce en FFCD cuando el pH pasa de 6,1 a 5,6 (Wales *et al.*, 2004). En FFCS también se observa un descenso del FNM cuando la incorporación de cantidades crecientes de concentrado a la dieta promueve una disminución del pH a valores por debajo de 6,0 (Wales *et al.*, 2009). No obstante, otros estudios realizados con FFCD no han detectado diferencias con distintos valores de pH (Calsamiglia *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002; Colombatto *et al.*, 2004). La variación en los valores del FNM en FFCD se ha atribuido al efecto conjunto del pH (39%) y de la dieta (61%), en el estudio llevado a cabo por Calsamiglia *et al.* (2008).

Parece pues que existe cierto potencial de los FFCS para reproducir el flujo de BP al duodeno y, por tanto, para realizar una adecuada simulación de la síntesis de proteína microbiana, cuando los valores de pH son parecidos a los del rumen. Los resultados aportados por Carro *et al.* (2009), en un estudio comparativo FFCS – rumen ovino, indican que este sistema *in vitro* simulaba el incremento del FNM duodenal, que se producía al aumentar la cantidad de concentrado en la dieta. Además, los valores encontrados por esos autores en fermentadores a los que se suministraban 30 g MS/día son similares al rango de los obtenidos en nuestras condiciones experimentales, cuando el aporte de alimento a los fermentadores era similar (0,35-0,44 y 0,34–0,52 g N/día, respectivamente). En un estudio comparativo FFCD – rumen de vacuno realizado por Hannah *et al.* (1986) se observaron relaciones similares *in vivo* e *in vitro* para los distintos tratamientos, en cuanto al FNM. Devant *et al.* (2001), sin embargo, no encontraron diferencias entre los tratamientos ensayados *in*

*vivo*, en relación al flujo de proteína microbiana al duodeno, mientras que los ensayos *in vitro*, realizados en paralelo, si que detectaron diferencias entre tratamientos.

**Los valores del cociente BP/N en las fracciones bacterianas, utilizadas como referencia para convertir el flujo duodenal de BP en flujo de N microbiano, parecen determinantes para la interpretación de los resultados, tanto *in vivo* como *in vitro*. El que, en la mayor parte de los casos, el FNM estimado responda a los distintos tratamientos de forma diferente a como lo hace el flujo de BP en rumen y en fermentadores, sugiere la existencia de algún error asociado al aislamiento de las fracciones bacterianas y/o al análisis del marcador en las mismas. La comparación *in vivo* - *in vitro* del flujo de BP revela que el potencial de simulación de los FFCS está supeditado al establecimiento de un pH, en el vaso de fermentación, similar al del rumen.**

#### **5.1.2. Estudio de las comunidades bacterianas presentes en el rumen y en fermentadores**

Algunas de las diferencias *in vivo* – *in vitro*, encontradas en ambos experimentos, en relación a ciertos parámetros de la fermentación ruminal y a la composición química de las bacterias aisladas, coinciden con otros estudios comparativos (Hannah *et al.*, 1986; Mansfield *et al.*, 1995; Ziemer *et al.*, 2000; Carro *et al.*, 2009) y sugieren la posibilidad de que el ambiente ruminal no se reproduzca adecuadamente en nuestros fermentadores y, por tanto, no haya sido posible mantener una composición de la microbiota similar a la del rumen. Para dilucidar este aspecto, en el experimento 2 se han comparado, mediante técnicas moleculares, la estructura y el tamaño de las comunidades bacterianas presentes en fermentadores y en el rumen de las cabras. En una primera aproximación (**publicación 4**), las muestras se sometieron a un análisis mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), una de las técnicas más extendidas y económicas para analizar la diversidad de microorganismos presentes en gran cantidad de muestras. Posteriormente, la composición de la microbiota se analizó mediante una técnica (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción terminales ó T-RFLP) de mayor



resolución (Nunan *et al.*, 2005), que permite una comparación taxonómica más precisa del conjunto de muestras (**publicación 5**). Con las limitaciones de cada una de las técnicas, ambas produjeron resultados similares, en consonancia con las observaciones de Smalla *et al.* (2007), mostrando una clara diferenciación en la composición y estructura de las comunidades bacterianas de los fermentadores y del rumen, y esto a pesar de que la diversidad, medida por el índice de Shannon, fue similar en la mayoría de los fermentadores. Este resultado fue más evidente con el análisis T-RFLP en el que la separación entre fermentadores y rumen, que aparece en el dendrograma (**publicación 5**), fue casi total para el conjunto de dietas estudiadas, a diferencia del agrupamiento obtenido con la DGGE (**publicación 4**), que mostraba una separación total únicamente con las dietas basadas en heno de alfalfa.

En cuanto al tamaño de la comunidad de bacterias totales, los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa eran similares en fermentadores y en el rumen (**publicación 5**), lo que indica que los FFCS son capaces de mantener una biomasa bacteriana similar a la del rumen (Ziemer *et al.*, 2000). Parece que a pesar de que tanto el número total de bacterias (PCR cuantitativa) como su diversidad (índice de Shannon) eran similares en fermentadores y en el rumen, la estructura de ambas comunidades bacterianas difería notablemente.

Diversidad y estructura microbiana son dos conceptos diferentes aunque complementarios. Mientras que la diversidad hace referencia a la abundancia relativa de especies, sin tener en cuenta qué especies componen la comunidad estudiada, la estructura analiza la composición de una comunidad en especies concretas. Un número similar de especies bacterianas en dos ecosistemas distintos no implica, necesariamente, que las especies presentes en ambos sean las mismas. La información disponible sobre las comunidades microbianas del rumen y de los sistemas de simulación *in vitro*, obtenida mediante métodos de cultivo, es escasa (Slyter y Putnam, 1967; Mansfield *et al.*, 1995; Gizzi *et al.*, 1998) al igual que lo es la obtenida mediante técnicas moleculares (Ziemer *et al.*, 2000; Strobel *et al.*, 2005; Muetzel *et al.*, 2009). En general, se ha observado una disminución drástica en el número de protozoos en los sistemas *in vitro*, atribuida fundamentalmente al efecto de lavado de esta población cuando las tasas de renovación empleadas en los fermentadores impiden su establecimiento. Los estudios comparativos, que han utilizado

técnicas de cultivo, han mostrado que no existen diferencias entre los sistemas *in vitro* y el rumen (Slyter y Putnam, 1967; Gizzi *et al.*, 1998) o que existen ligeras diferencias en grupos bacterianos concretos (Mansfield *et al.*, 1995), que no impiden una correcta simulación de la mayor parte de los parámetros de la fermentación ruminal. Por el contrario, la mayoría de los estudios que han utilizado técnicas moleculares para la caracterización de las comunidades bacterianas del rumen y de los fermentadores reconocen diferencias en grupos o especies concretos, lo que no excluye la posibilidad de que exista en fermentadores una estructura microbiana funcional similar a la del rumen (Ziemer *et al.*, 2000). Es probable que la diferente composición o estructura de las comunidades bacterianas encontradas en el presente trabajo, en el rumen de caprino y en FFCS, sea responsable de algunas de las diferencias observadas en el perfil de AGV y en la relación BP/N de las fracciones bacterianas aisladas, ya que tanto el tipo de productos resultantes de la fermentación ruminal (Russell y Wallace, 1988; en Hobson the rumen microbial ecosystem) como la concentración de purinas (Obispo y Dehority, 1999) difiere según el tipo de especies bacterianas consideradas. Sin embargo, esto no impidió que otros parámetros de la fermentación ruminal estudiados se comportaran de forma similar *in vivo* e *in vitro*, probablemente debido a que las comunidades bacterianas en los FFCS fueron igualmente diversas y funcionales que las del rumen.

A lo largo de la discusión de este primer bloque se ha puesto cierto énfasis en la importancia que tiene el pH para simular la fermentación ruminal *in vitro*, sugiriéndose un mayor potencial de los FFCS cuando el rango de valores de pH es similar al encontrado en el rumen. La aplicación de técnicas moleculares muestra que la diversidad de las comunidades bacterianas de los FFCS, analizadas mediante el índice de Shannon (**publicación 5**), disminuyó significativamente cuando los valores de pH medio descendieron por debajo de 6,0 y que los FFCS con un pH inferior a este valor (aquellos alimentados con 45 g MS de dietas con alto contenido en concentrado) mostraban una estructura bacteriana totalmente distinta de aquellos que mantenían un pH medio superior a 6,0 (**publicación 5**). Este hallazgo confirma la enorme importancia que tiene el pH en los sistemas de simulación *in vitro*, y está en consonancia con el papel modulador de la fermentación ruminal que muchos

autores le han atribuido por su efecto directo sobre las comunidades bacterianas. Los resultados de Tajima *et al.* (2000) confirmaron, mediante PCR cuantitativa, los cambios en la composición de la comunidad bacteriana, que experimenta el rumen cuando el pH disminuye al cambiar de una ración rica en forraje a otra rica en concentrado.

Por último, sin redundar en lo que se ha discutido en la publicación correspondiente, parece que la capacidad de los fermentadores para discriminar la composición en especies de casi todas las fracciones bacterianas en función de la dieta consumida, de una forma similar a lo que ocurre en el rumen (**publicación 5**), se corresponde con los resultados de los parámetros de fermentación analizados. Por tanto, a pesar de que existen discrepancias en la estructura bacteriana de ambos ecosistemas los FFCS son capaces de simular los cambios en las comunidades bacterianas en respuesta a los diferentes tratamientos de forma similar a lo que ocurre *in vivo*. Esto confirmaría el potencial de los FFCS para comparar tratamientos entre sí. Además, la inadecuada simulación de la fermentación ruminal *in vitro*, con dietas de peor calidad, se confirma en el análisis discriminante del experimento 2 (**publicación 5**) en el que el único tratamiento que no se agrupó de igual forma *in vivo* e *in vitro* fue la dieta GF.

**Los resultados obtenidos, mediante la aplicación de técnicas moleculares, indican que la composición y estructura de las comunidades bacterianas del rumen y de los FFCS son diferentes, aunque su tamaño y abundancia relativa de especies no difiera significativamente cuando el valor de pH es superior a 6,0. Por otro lado, se confirma parcialmente la capacidad de estos sistemas *in vitro* para discriminar la estructura bacteriana, inducida por distintos tratamientos, de forma similar a lo que acontece en el rumen.**

### **5.1.3. Digestibilidad de los nutrientes**

Los valores de digestibilidad, obtenidos en los ensayos *in vitro* de los experimentos 1 y 2 (**publicaciones 1 y 3**), representan la degradación de los distintos nutrientes en el rumen. Dado que en ninguno de los ensayos *in vivo* se ha determinado la degradabilidad ruminal de las dietas, sino únicamente su

digestibilidad aparente a lo largo del tracto digestivo total, podrían existir ciertas limitaciones para realizar un análisis comparativo *in vivo* – *in vitro*. Sin embargo, se ha observado que distintos efectos, ligados a la dieta, afectan de igual manera a ambos parámetros, al existir una relación entre la degradación de las dietas en el rumen y su digestibilidad aparente total (Cerrillo *et al.*, 1999; Vicente *et al.*, 2004). El ARC (1980) establece valores variables de la cantidad de MO digestible que aparentemente fermenta en el rumen, en función del tipo de dieta consumida. Para dietas mixtas forraje-concentrado establece valores medios de 65% y 68%, para vacuno y ovino respectivamente, cercanos al encontrado por Archimède *et al.* (1997), de 64,7 % en una revisión de varios trabajos. Sin embargo, la cantidad de MO digestible que realmente fermenta en el rumen puede ser sensiblemente mayor, llegando a superar el 75% (INRA, 1988). En estudios realizados en caprino, se han obtenido valores que oscilan entre 81 y 85%, dependiendo de la relación F:C en la dieta (Cerrillo *et al.*, 1999) y, entre 72 y 84% dependiendo del contenido en proteína bruta (Soto-Navarro *et al.*, 2006). Además, resultados encontrados por otros autores en caprino (García *et al.*, 1995; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2004a, 2007) revelan que la degradabilidad efectiva de las dietas en el rumen contribuye, en una elevada proporción, a la digestibilidad aparente de las mismas. En otras especies de ruminantes se han encontrado valores similares (Kung *et al.*, 1992; Vicente *et al.*, 2004; Owens *et al.*, 2008) e incluso situaciones en las que la MO que realmente fermenta en el rumen es, paradójicamente, superior a la MO aparentemente digestible en el tracto digestivo total (Jetana *et al.*, 2000; Currier *et al.*, 2004). Esto pone de manifiesto la importante contribución que la degradación ruminal de las dietas, especialmente si se refiere como digestibilidad verdadera, tiene en el resultado final de la digestibilidad total. Por tanto, parece posible evaluar, con ciertas reservas, en nuestras condiciones experimentales, el potencial de los FFCS para simular este aspecto (Carro *et al.*, 2009).

La digestibilidad verdadera de la MO (DvMO), calculada detrayendo la MO microbiana de la MO total, en el ensayo *in vitro* del exp. 1 (**publicación 1**) era similar para los tratamientos estudiados, lo que coincide con los datos de concentración de AGV, obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro*. Los valores son inferiores a los encontrados en FFCS alimentados con dietas de igual o peor

calidad (Karunanandaa y Varga, 1996; Meng *et al.*, 1999; Carro *et al.*, 2009) pero, de la misma magnitud que los obtenidos en otros trabajos también realizados con FFCS (Dahlberg *et al.*, 1988; Bach *et al.*, 1999; Tapia *et al.*, 2002). La digestibilidad de la MO, en condiciones *in vitro*, está muy afectada por el pH (de Veth y Kolver, 2001; Calsamiglia *et al.*, 2001, 2008) y las tasas de dilución empleadas (Fu *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 1999), lo que limita enormemente la comparación de resultados entre estudios, a pesar de que se utilicen dietas y sistemas *in vitro* parecidos. El análisis del potencial que los FFCS presentan, con respecto a la digestión de nutrientes, es limitado según los datos obtenidos en el exp. 1.

En la **Tabla 5.3** se recopilan los resultados obtenidos en el exp. 2, en relación a la digestibilidad de los nutrientes *in vivo* (**publicación 2**) e *in vitro* (**publicación 3**). En ella se observa que únicamente cuando el pH del fermentador es similar al del rumen (fermentadores a los que se suministraron 30 g MS/día), la contribución de la DvMO a la digestibilidad aparente de la MO se situó dentro del rango (76 – 82 %) encontrado por algunos autores (Cerrillo *et al.*, 1999; Soto-Navarro *et al.*, 2006), lo que no sucedió en aquellos fermentadores cuyos valores medios de pH eran diferentes de los del rumen (fermentadores a los que se suministraban 45 g MS/día). El efecto del pH ruminal sobre la digestibilidad de la dieta se ha evaluado en FFC (Erflé *et al.*, 1982; Colombatto *et al.*, 2004), y se ha observado una disminución de la digestibilidad cuando el pH medio se establece por debajo de cierto límite. Sin embargo, estudios recientes sugieren que el factor determinante no es el pH medio alcanzado sino el tiempo durante el que el pH permanece en valores subóptimos (de Veth y Kolver, 2001; Cerrato *et al.*, 2007), junto con la magnitud de las variaciones de su valor (Wales *et al.*, 2004). Ello implica que un descenso transitorio del pH por debajo del nivel óptimo podría tener efectos pequeños o incluso insignificantes (Calsamiglia *et al.*, 2002). El que el pH, registrado durante 12 horas en los FFCS alimentados con 45 g MS/día, estuviera la mayor parte del tiempo por debajo de 6,0, con casi todas las dietas ensayadas (**publicación 3**), podría determinar la baja degradabilidad ruminal de las dietas obtenida en estos fermentadores, en comparación con aquellos que recibían 30 g MS/día.

**Tabla 5.3.** Datos comparativos *in vivo* – *in vitro* relativos a la digestibilidad de distintos nutrientes (experimento 2).

|   |                      | Dietas <sup>1</sup> |                    |                   |                   | EEM <sup>2</sup> | P- valor |         |         |
|---|----------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------|---------|---------|
|   |                      | GF                  | AF                 | GC                | AC                |                  | F        | F:C     | F x F:C |
| Digestibilidad aparente de la materia orgánica, %           | Caprino              | 67,7 <sup>a</sup>   | 68,9 <sup>a</sup>  | 80,5 <sup>b</sup> | 77,4 <sup>b</sup> | 0,53             | 0,09     | <0,001  | 0,07    |
|   | 30 FFCS <sup>3</sup> | 38,9 <sup>a</sup>   | 40,7 <sup>ab</sup> | 44,1 <sup>b</sup> | 44,0 <sup>b</sup> | 0,58             | 0,48     | 0,003   | 0,46    |
|   | 45 FFCS <sup>4</sup> | 38,4                | 38,7               | 40,7              | 40,5              | 0,55             | 0,98     | 0,07    | 0,80    |
| Digestibilidad verdadera de la materia orgánica, %          | 30 FFCS              | 51,8 <sup>a</sup>   | 57,3 <sup>b</sup>  | 63,2 <sup>c</sup> | 63,8 <sup>c</sup> | 0,47             | 0,007    | <0,001  | 0,03    |
|   | 45 FFCS              | 49,7 <sup>a</sup>   | 52,6 <sup>ab</sup> | 56,7 <sup>b</sup> | 55,6 <sup>b</sup> | 0,52             | 0,41     | <0,001  | 0,06    |
| Digestibilidad aparente de los carbohidratos no fibrosos, % | Caprino              | 82,8 <sup>a</sup>   | 85,3 <sup>ab</sup> | 93,0 <sup>b</sup> | 89,8 <sup>b</sup> | 1,38             | 0,90     | 0,009   | 0,25    |
|   | 30 FFCS              | 41,5 <sup>a</sup>   | 53,3 <sup>b</sup>  | 55,1 <sup>b</sup> | 58,4 <sup>b</sup> | 1,84             | 0,009    | 0,04    | 0,05    |
|   | 45 FFCS              | 38,1 <sup>a</sup>   | 48,0 <sup>b</sup>  | 53,7 <sup>b</sup> | 54,0 <sup>b</sup> | 1,62             | 0,02     | 0,03    | 0,08    |
| Digestibilidad aparente de la fibra neutro detergente, %    | Caprino              | 63,6 <sup>b</sup>   | 55,4 <sup>a</sup>  | 71,8 <sup>c</sup> | 67,2 <sup>b</sup> | 0,39             | <0,001   | < 0,001 | 0,07    |
|   | 30 FFCS              | 49,6 <sup>a</sup>   | 51,3 <sup>a</sup>  | 57,2 <sup>b</sup> | 58,9 <sup>b</sup> | 0,54             | 0,30     | <0,001  | 0,63    |
|   | 45 FFCS              | 44,3                | 40,2               | 45,8              | 42,1              | 0,85             | 0,11     | 0,12    | 0,83    |

<sup>1</sup> GF = 70% heno de gramíneas + 30% concentrado; AF = 70% heno de alfalfa + 30% concentrado; GC = 30% heno de gramíneas + 70% concentrado; AC = 30% heno de alfalfa + 70% concentrado

<sup>2</sup> EEM = error estándar de la media

<sup>3</sup> 30 FFCS = Fermentadores de flujo continuo simple alimentados con 30 g MS/d de cada una de las dietas experimentales.

<sup>4</sup> 45 FFCS = Fermentadores de flujo continuo simple alimentados con 45 g MS/d de cada una de las dietas experimentales

En la Tabla 5.3 se aprecia como el efecto de la cantidad de concentrado en la dieta (F:C) sobre la digestibilidad de todos los nutrientes estudiados se simula adecuadamente en aquellos fermentadores (30 FFCS) en los que los valores medios de pH eran cercanos a los encontrados en el rumen de animales alimentados con las mismas dietas. No obstante, el potencial de simulación de los FFCS parece depender de la calidad de la dieta como se ha sugerido previamente en trabajos de nuestro grupo (Moumen, 2003). Los factores que apuntan a esa influencia de la calidad de la dieta en el potencial simulador de los fermentadores son los siguientes: i) en los fermentadores 30 FFCS se observa una interacción de los efectos estudiados (F x F:C,  $P \leq 0,05$ ) en la digestibilidad verdadera de la MO y la digestibilidad aparente de los carbohidratos no fibrosos, circunstancia que no ocurre *in vivo*; ii) el efecto del tipo de forraje utilizado no se simula adecuadamente en casi ninguno de los parámetros de digestibilidad analizados. Si se analiza la relación entre tratamientos y se comparan dietas con la misma cantidad de concentrado y distinto forraje (GF vs. AF y GC vs. AC), se aprecia como las diferencias *in vivo* – *in vitro* se reducen a las dietas ricas en forraje.

**En general, el efecto de la cantidad de concentrado en la dieta sobre la digestibilidad de distintos nutrientes se simula adecuadamente, tanto mejor cuanto más se aproximen los pH de fermentadores y del rumen. La calidad del forraje puede influir en el potencial simulador de los fermentadores.**

## **5.2. Efectos de la disminución de la cantidad de concentrado en la dieta del ganado caprino**

La disminución de la cantidad de concentrado en la dieta de caprino se ha abordado mediante dos estrategias: i) sustitución parcial del concentrado por bloques multinutrientes, elaborados a partir de distintos recursos alimenticios autóctonos entre los que se incluye un 10-12% de alperujo procedente de la extracción del aceite de oliva mediante el proceso de “extracción en dos fases”, un subproducto de difícil gestión medioambiental por su elevado contenido en agua (**experimento 1**) y, ii) reducción de un concentrado comercial en dietas

mixtas aumentando la relación forraje – concentrado (F:C) de 30:70 a 70:30, con heno de gramíneas o heno de alfalfa (**experimento 2**).

La formulación de los bloques multinutrientes (exp. 1) representa una reducción en la cantidad de cereales empleados del 60% (bloque I) y 75% (bloque II), en comparación con el concentrado utilizado en la dieta control. Teniendo en cuenta las ingestas reales de concentrado y bloques, encontradas en los animales a los que se suministraban las distintas dietas, el consumo de cereales se reduce aproximadamente un 32% con las dietas que incluyen bloques multinutrientes, en comparación con la dieta control.

Las dietas con mayor relación F:C (70:30) en el exp. 2 representan una reducción del 57% de concentrado, con respecto a aquellas que tienen una menor relación F:C (30:70). Dado que el concentrado incluye 719 g de cereales y subproductos de cereales por kg de MS, la reducción en el uso de cereales con las dietas que contienen la menor proporción de concentrado representa un 41%, en comparación con aquellas que incluyen una mayor proporción de concentrado.

Ambas estrategias representan una importante reducción de los costes de alimentación cuando los precios de los cereales estén muy por encima del valor de otras materias primas. El precio de los cereales ha experimentado un importante aumento en la última década; así, el precio medio del trigo, maíz y sorgo, que en 2003/04 fue de 134 dólares/tonelada pasó, en 2007/08, a 264 dólares/tonelada (Crop prospects and Food situation, FAO, 2009). Las estrategias abordadas en el presente trabajo también contribuyen a paliar la competencia entre animales y humanos por el uso de cereales en su alimentación (Vasta *et al.*, 2008), tan crítica en países en vías de desarrollo (Yotopoulos, 1985). Adicionalmente, con la estrategia abordada en el exp. 1 se obtiene un beneficio ambiental ya que contribuye al reciclado de un residuo, con potencial contaminante y cuya gestión ambiental es difícil y costosa.

### **5.2.1. Efectos sobre la fermentación ruminal**

La cantidad de concentrado en la dieta afectó únicamente a los valores de pH encontrados en el rumen de caprino en el exp. 2 (**publicación 2**), menores cuando los animales consumían las dietas con la mayor proporción de concentrado, en consonancia con los resultados obtenidos en otros estudios



realizados con caprino (Hadjipanayiotou y Antoniou, 1983; Archimède *et al.*, 1996; Cerrillo *et al.*, 1999; Tripathi *et al.*, 2007). El contenido de la dieta en carbohidratos fácilmente degradables, como el almidón, determina la disminución del pH en el rumen (Mould *et al.*, 1983; Wang *et al.*, 2009), debido, tanto a las elevadas concentraciones de AGV y lactato que resultan de su rápida y extensa fermentación, como a la disminución de la producción de saliva, asociada a tiempos de masticación y rumia bajos (Emery y Brown, 1961; Balch, 1971). El concentrado que se utilizó en el exp. 2, a pesar de contener algunos cereales y subproductos de cereales, presenta una proporción relativamente baja en almidón. Los dos cereales de mayor contenido en almidón (trigo, 77%; Herrera-Saldana *et al.*, 1990 y maíz, 72%; Larson *et al.*, 1993) representan, en su conjunto, el 10% del concentrado, mientras que la cebada, caracterizada por un contenido medio de almidón (Nocek y Tamminga, 1991), representa el 21,5%. Por otro lado, los dos subproductos de cereales utilizados, gluten de maíz y salvado de trigo, presentes en una proporción de aproximadamente un 40%, se caracterizan por su bajo contenido en carbohidratos fácilmente fermentables (Nocek y Tamminga, 1991). Estos datos justifican que las concentraciones de AGV sean similares para las distintas dietas utilizadas en el exp. 2, independientemente del porcentaje de concentrado que contienen. Es probable que el menor pH ruminal, promovido por la ingestión de las dietas ricas en concentrado (GC y AC), se deba a una menor producción de saliva, asociada a tiempos de masticación y rumia cortos (Krause *et al.*, 2002; Beauchemin *et al.*, 2003). Ello explicaría que, a pesar de que las dietas GC y AC contienen un alto porcentaje de concentrado, el pH ruminal, a lo largo de las 12 horas de monitorización (**publicación 3**) de los animales que las consumían, no descendió a los valores observados en otros estudios con dietas que tenían una relación F:C similar (Abijaoudé *et al.*, 2000; Khalili *et al.*, 2000). El que la fermentación de dichas dietas produzca cantidades elevadas de N amoniacal pudo también contribuir a un descenso menos acusado del pH (Owens *et al.*, 1998; Archimède *et al.*, 1996). Los valores de pH ruminal, encontrados en los animales del exp. 1, que recibían las distintas dietas, fueron estadísticamente similares, aunque se observaron valores más bajos con la dieta AC, cuya proporción de concentrado era superior a la de las dietas que incluían bloques multinutrientes. Probablemente

la reducción de la cantidad del concentrado fue insuficiente para promover cambios significativos en el pH, a pesar del alto contenido en cereales del mismo, o quizá contribuyó el carácter tamponador que se atribuye a los forrajes de leguminosas (Dixon y Sockdale, 1999) como la alfalfa. El hecho de que el aumento en la proporción de concentrado en la dieta no reduzca el pH ruminal (Andrade y Schmidely, 2006; Tripathi *et al.*, 2007; Zebeli *et al.*, 2008) puede explicarse, en parte, por el tipo de carbohidratos que contiene el concentrado (Ørskov y Fraser, 1975; Mould *et al.*, 1983). Los valores de pH, encontrados en nuestros experimentos, eran superiores a los valores umbral propuestos (Pitt *et al.*, 1996; de Veth y Kolver, 2001; Calsamiglia *et al.*, 2002; Wales *et al.*, 2004; Cerrato-Sánchez *et al.*, 2007b) para una digestión óptima de la fibra, lo que hace suponer que en estas condiciones no se producen interacciones digestivas negativas entre el forraje y el concentrado, descritas por algunos autores (Mould y Ørskov, 1983; Dixon y Stockdale, 1999). Sin embargo, en otros trabajos (Mould *et al.*, 1983; Archimède *et al.*, 1995) se ha descrito que esas interacciones digestivas negativas no se deben exclusivamente al descenso del pH sino que, existe un efecto del almidón independiente del pH ruminal alcanzado. Esta es una de las razones por las que actualmente se está dando importancia, en la producción de rumiantes, a los alimentos concentrados con un elevado contenido en fibra digestible y bajo en almidón (Ørskov, 1999), que tan buenos resultados ha dado en el ganado caprino según algunos autores (Madrid *et al.*, 1997).

La producción de AGV depende tanto de la naturaleza de la dieta (Van Soest, 1982) como del patrón de alimentación del animal (Czerkawski, 1986). Los AGV representan aproximadamente un 60-70% del aporte de energía en los rumiantes (Van Soest, 1982; Armentano *et al.*, 1992) y su producción es proporcional a la cantidad de MO degradada en el rumen (INRA, 1988). Además, siempre que la disponibilidad del N sea adecuada, la energía liberada durante la fermentación de los carbohidratos hasta AGV repercutirá positivamente en la cantidad de masa microbiana producida en el rumen (Ørskov *et al.*, 1968), tanto más cuanto mejor sincronización exista entre la liberación de energía y de N. La concentración de AGV, en ambos experimentos, presentaba el mismo rango de valores, lo cual era esperable ya que las dietas son bastante parecidas y las ingestas resultaron próximas al

mantenimiento. Además, este rango (68,8 - 94,6 mmol/l) fue similar a los valores encontrados por otros autores en el rumen de cabras alimentadas con dietas también similares a las estudiadas en nuestros ensayos (Alrahmoun *et al.*, 1986; Santini *et al.*, 1992; Archimède *et al.*, 1996). Por otro lado, se observa que la concentración de AGV en rumen no se afecta por la disminución del concentrado en la dieta, lo que sugiere un grado de fermentación de los carbohidratos en el rumen similar, independientemente de la cantidad de concentrado utilizada en las dietas para cabras en mantenimiento, como algunos autores han observado (García *et al.*, 1994; Archimède *et al.*, 1996; Cerrillo *et al.*, 1999; Islam *et al.*, 2000). Resultados similares se han obtenido también en cabras en lactación (Andrade y Schmidely, 2006), ovejas en mantenimiento (Carro *et al.*, 2009) y vacuno en producción (McAllan *et al.*, 1994; Lascano y Heinrichs, 2009). Sin embargo, con frecuencia se describe un efecto positivo del nivel del concentrado sobre la concentración de AGV en rumen (Owens *et al.*, 2008) como consecuencia, probablemente, de una mayor degradación ruminal de los alimentos concentrados, en comparación con los forrajes. La controversia existente acerca del efecto de la cantidad de concentrado en la dieta sobre la degradabilidad y la concentración de AGV en rumen se debe, principalmente, a los efectos asociativos o de interacción entre concentrados y forrajes, responsables de que la ingesta de energía digestible en dietas mixtas forraje-concentrado sea mayor o menor que la esperada cuando se emplea uno solo de sus componentes (Dixon y Stockdale, 1999). Los efectos positivos de esta interacción ocurren cuando un forraje, que contiene una baja concentración de un nutriente limitante para el crecimiento de los microorganismos del rumen, se suplementa con concentrados que tienen una alta proporción de dicho nutriente. Por el contrario, los efectos negativos de la interacción suelen explicarse por una disminución del pH y, probablemente, por un efecto del contenido en almidón del concentrado (Mould *et al.*, 1983; Mould y Ørskov, 1983), que se traducen en una menor ingesta/digestión de la dieta consumida. Entre estos dos extremos existe una amplia variedad de respuestas que dependen, en último término, de la cantidad (NRC, 2001) y calidad (Verité y Dulphy, 1981; Archimède *et al.*, 1996) del concentrado añadido así como del tipo de forraje considerado (INRA, 1988). Dado que la concentración de AGV está relacionada con su producción (Bondi,

1988), la ausencia de diferencias en éste parámetro en nuestros ensayos podría indicar una degradación ruminal similar de las dietas, con independencia de la cantidad de concentrado comercial que dichas dietas incluyan. Este hecho se ha constatado, parcialmente, en los ensayos *in vitro* en los que la digestibilidad verdadera de la MO, que alude a su degradabilidad en el rumen, es similar para todas las dietas ensayadas en el exp. 1 (**publicación 1**). Sin embargo, en el exp. 2 la sustitución de parte del concentrado por forraje solo disminuyó la degradabilidad cuando se utilizó el heno de gramíneas. Ello podría deberse bien a por una interacción positiva del nivel del concentrado cuando se utiliza este forraje o a una simulación inadecuada con este tipo de dietas, como se ha apuntado en la sección anterior de esta discusión.

Las proporciones molares de AGV individuales varían al cambiar la cantidad de concentrado en la dieta de rumiantes (Russell, 1998; Khalili *et al.*, 2000; Yáñez-Ruíz *et al.*, 2004b; Lascano y Heinrichs, 2009). Dietas ricas en forraje dan lugar a proporciones elevadas de acetato y, aquellas otras ricas en concentrado, promueven un incremento de la proporción de propionato (INRA, 1988). Los resultados de los exp. 1 y 2 indican que las proporciones molares de los AGV individuales cambiaban únicamente cuando parte del concentrado se sustituía por heno de gramíneas, circunstancia que no sucedía cuando el concentrado se sustituía por bloques multinutrientes (**publicación 1**) o por heno de alfalfa (**publicación 2**). Este efecto diferencial del concentrado sobre las proporciones molares de los AGV (**publicación 2**), en función de la calidad del forraje utilizado, también ha sido descrito por McAllan *et al.* (1994) en ganado vacuno.

La concentración de N-amoniaco en el rumen representa un equilibrio entre la cantidad de N procedente de la degradación del alimento, la utilizada por los microorganismos para la síntesis de proteína microbiana, su absorción a través de las paredes del rumen, el reciclado de urea y la lisis bacteriana. Los péptidos y aminoácidos (AA) resultantes de la actividad proteolítica de los microorganismos son transportados al interior de las células microbianas. Una vez allí, los péptidos pueden degradarse por la acción de peptidasas para dar lugar a AA. Estos pueden incorporarse a la proteína microbiana o bien desaminarse, dando lugar a AGV, CO<sub>2</sub> y amoníaco (Tamminga, 1979). El destino de los péptidos y aminoácidos dependerá de la disponibilidad de

energía en el rumen (Bach *et al.*, 2005). Si existe energía disponible, los AA serán transaminados o utilizados directamente para la síntesis de proteína microbiana, mientras que si la energía es limitante, los AA serán desaminados y sus esqueletos carbonados fermentarán produciendo AGV, obteniendo así la energía requerida. Esto explica la interrelación que existe entre las concentraciones de AGV y de amoniaco en el rumen y la síntesis de proteína microbiana. En los ensayos *in vivo* de los experimentos 1 y 2 se mantuvo la concentración de N-amoniaco en el rumen al disminuir la cantidad de concentrado en la dieta, cuando este se sustituyó por los bloques multinutrientes (exp. 1) o el heno de alfalfa (exp. 2), probablemente porque tanto su contenido en N total como la degradabilidad de su proteína son comparables a las del concentrado (**publicaciones 1 y 2**). Por el contrario, cuando se utilizó heno de gramíneas para sustituir parte del concentrado (dieta GF) la concentración de N-amoniaco en el rumen se redujo como consecuencia de su menor contenido en N y degradabilidad de su proteína (**publicación 2**) que, a su vez, repercutieron en una disminución de la síntesis de proteína microbiana con respecto a la dieta de mayor relación F:C (dieta GC). Debido a los múltiples factores que determinan la concentración de N amoniaco en el rumen, la información relativa a este parámetro cuando se aumenta la proporción de concentrado en la dieta es contradictoria. En algunos casos, la concentración de N amoniaco aumentó al hacerlo el concentrado (Moss y Givens, 2002; Das y Gosh, 2007), mientras que en otros no lo hizo (Hadjipanayiotou y Antoniou, 1983) o incluso disminuyó (Molina-Alcaide *et al.*, 1997; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2004a). Además, se ha observado que la concentración de este parámetro está influenciada por el tipo de forraje al que se suplementa con concentrado (Keady y Mayne, 2001), en consonancia con los resultados observados en el exp. 2.

**La sustitución parcial del concentrado en dietas para caprino tiene un efecto mínimo sobre los parámetros de la fermentación ruminal, siempre que dicho concentrado se sustituya por alimentos de cierta calidad nutritiva. En el exp. 2 se ha confirmado que el efecto de la cantidad de concentrado en dietas mixtas depende de la calidad del forraje incluido. El término “relación F:C” puede ser ambiguo ya que su**

**efecto depende no solo de la calidad del forraje considerado o de la cantidad de concentrado añadido sino también y, muy especialmente, del tipo de carbohidratos que incluya el concentrado.**

### **5.2.2. Efectos sobre la síntesis de proteína microbiana**

La excreción urinaria de DP es un indicador del flujo de BP al duodeno y, por tanto, de la síntesis de proteína microbiana que tiene lugar en el rumen (Martín-Orúe *et al.*, 2000). Este indicador se ha utilizado (Ben Salem *et al.*, 1999; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2004a; Wang *et al.*, 2009) para comparar el efecto que tienen distintos tratamientos sobre la síntesis de proteína microbiana. Los resultados de nuestros trabajos (**Tablas 5.1 y 5.2** de la sección anterior de este capítulo) muestran una tendencia similar en las dos estrategias utilizadas para intentar disminuir el uso de concentrados en la alimentación del ganado caprino: las dietas con mayores proporciones de concentrado promovieron excreciones superiores de DP en orina solo cuando se comparaba con las dietas que incluían el bloque II (dieta AC vs. ACBII), en el exp. 1, o una alta proporción de heno de gramíneas (dieta GC vs. GF), en el exp. 2. Por el contrario, no se observó una reducción significativa en la excreción urinaria de DP cuando la sustitución de una parte del concentrado se realizó con el bloque I (dieta AC vs. ACBI) o con heno de alfalfa (dieta AC vs. AF). En el caso de las dietas del exp. 2, que incluyen heno de alfalfa (**publicación 2**), se ha apuntado como posible causa de que la excreción de DP en orina no disminuyera drásticamente cuando parte del concentrado era reemplazado, el que el contenido y la degradabilidad del N de este forraje presente valores similares a los del concentrado reemplazado. En el exp. 1 (**publicación 1**), a pesar de que las dietas experimentales presentaban una degradación de la MO y de la proteína de la dieta en rumen similares, la excreción de DP en orina fue distinta para la dieta ACBII, con respecto a la dieta control, lo que no ocurría con la dieta ACBI. Este efecto podría deberse a una peor sincronización entre la fermentación de la MO y la degradación de la proteína de la dieta, como indica el que la concentración de N amoniacal sea más elevada con la dieta ACBII (14,5 mg/dl) que con las dietas AC y ACBI (10,9 y 11,4 mg/dl, respectivamente).

Parece existir consenso en establecer una relación entre la cantidad de MO digestible ingerida por los pequeños rumiantes y la excreción urinaria de DP (Chen *et al.*, 1992; Balcells *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 1998; Fujihara *et al.*, 2005). Sin embargo, algunos autores no han encontrado diferencias en los DP excretados en orina con distintas ingestas de MO digestible (Chen *et al.*, 1992; Fujihara *et al.*, 2005). El aumento del concentrado en dietas a base de heno de alfalfa (exp. 2) podría no promover una degradación de la MO en rumen suficientemente distinta, como lo demuestran los datos obtenidos *in vitro*, para provocar diferencias, tanto en la concentración de AGV en el rumen, comentada anteriormente, como en la excreción de DP en orina. Ben Salem y Znaidi (2008) observaron que la sustitución de una parte del concentrado (33,7 g/Kg<sup>0,75</sup>) por bloques, que incorporaban subproductos del olivar, incrementó tanto la ingesta de proteína digestible como la excreción de alantoína, a pesar de que la ingesta de MO digestible disminuyó significativamente. En el mismo sentido, Kaur *et al.* (2008) no encontraron, en ganado ovino, una relación entre la cantidad de MO digestible consumida por los animales y la excreción de alantoína en orina, al aumentar la proporción de concentrado en dietas isonitrogenadas. Esto subraya el importante papel que juega la disponibilidad de N en el crecimiento microbiano cuando la energía no es limitante. En el sistema francés de valoración de alimentos para rumiantes se describe bien esta situación con la definición de proteína digestible en el intestino (PDI), de forma que cada alimento puede, en teoría, aportar dos cantidades diferentes de N en forma de AA absorbibles en intestino según exista un déficit en la dieta de energía (PDIE) ó de nitrógeno (PDIN).

El flujo de N microbiano al duodeno, estimado a partir de la excreción de DP en orina, estuvo en ambos experimentos claramente influenciado por la fracción bacteriana utilizada como referencia, de acuerdo con resultados obtenidos *in vivo* (Martín-Orúe *et al.*, 2000) e *in vitro* (Rodríguez-Prado *et al.*, 2004; Molina-Alcaide *et al.*, 2008). Además, el patrón de respuesta a los efectos de los tratamientos difería en función de la fracción bacteriana de referencia, en consonancia con los resultados de un estudio realizado con FFCD (Rodríguez-Prado *et al.*, 2004). Por otro lado, en ninguno de los dos estudios realizados *in vivo* (exp. 1 y 2) el flujo de N microbiano respondió a los tratamientos de la misma forma que lo hizo la excreción de DP en orina, en

contra de las observaciones realizadas por numerosos autores (Pérez *et al.*, 1996; Martín-Orúe *et al.*, 2000; González-Ronquillo *et al.*, 2002; Moorby *et al.*, 2006). En este sentido, algunos estudios (Valadares *et al.*, 1999; Devant *et al.*, 2000, 2001) han optado por aplicar un valor medio del cociente BP/N, obtenido en las fracciones bacterianas aisladas en sus condiciones experimentales, y así obviar la variabilidad asociada a los efectos del animal y de la dieta en el cálculo de dicho parámetro, evitando situaciones en las que los valores de flujo de N microbiano al duodeno no presentan la misma tendencia que la excreción de DP en orina. Las ecuaciones de predicción de flujo de N microbiano al duodeno, desarrolladas para la especie caprina (Belenguer *et al.*, 2002; Mota *et al.*, 2008) y ovina (Chen *et al.*, 1990, 1992) asumen un valor constante de ese cociente, independientemente de la fracción microbiana utilizada como referencia, dieta consumida y plano de alimentación del animal. Así, aquellos estudios que han utilizado dichas ecuaciones sin aislar fracciones bacterianas, y, por tanto, utilizando el valor constante propuesto por el modelo, han obtenido consecuentemente la misma tendencia en la excreción urinaria de DP y en el flujo de N microbiano (Carro *et al.*, 2000; Santoso *et al.*, 2006; Giraldo *et al.*, 2008). El modelo propuesto para establecer la relación, en caprino, entre la cantidad de bases púricas infundidas en duodeno y la excreción urinaria de DP (Belenguer *et al.*, 2002), utiliza un valor de 1,97 obtenido en BAL.

En los experimentos *in vivo*, cuyos resultados se recogen en la presente memoria de tesis doctoral, se ha aislado no solo la fracción BAL sino también la de bacterias asociadas a la fase sólida del contenido ruminal (BAS) para cada animal y dieta, atendiendo a las diferencias encontradas en el valor de dicho marcador en función de la fracción microbiana tomada como referencia (Carro, 2001; Tas y Susenbeth, 2007; Bessa *et al.*, 2009), dieta consumida (Martín-Orúe *et al.*, 2000; Reynal y Broderick, 2005) ó plano de alimentación (Pérez *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2000). Los valores de la relación BP:N, analizados en diferentes fracciones bacterianas son una importante fuente de variación en la estimación del flujo de N microbiano (Tas y Susenbeth, 2007). En el exp. 1 se han encontrado diferencias debidas a la dieta consumida y, ello a pesar de que las dietas solo variaron en torno a un 20-30% en cuanto a su composición en ingredientes. En el exp. 2 no existieron diferencias significativas en el valor BP:N debidas a la dieta, pero su aplicación para el cálculo del flujo duodenal de



N microbiano cambió el patrón de respuesta a la dieta, en comparación con el que mostraban los valores de excreción urinaria de DP. En una revisión realizada por Carro (2001) sobre distintos marcadores microbianos utilizados para la estimación de la síntesis de proteína microbiana se puso de manifiesto la gran variabilidad en el valor BP:N encontrado por diferentes autores al utilizar distintas dietas, fracciones microbianas y técnicas de aislamiento en vacuno y ovino. En relación, por ejemplo, al valor del cociente BP/N en BAS un mismo autor ha encontrado, en ovino, valores que oscilan entre 0,60 para una dieta F:C 65:35 a base de heno (Pérez *et al.*, 1996) y 1,71 para una dieta F:C 50:50 a base de paja (Pérez *et al.*, 1998). Estos datos subrayan la importancia que tiene la determinación del valor del ratio BP:N y la gran influencia que ejerce sobre la estimación del FNM al duodeno. Parece pues, que los datos bibliográficos que apuntan a la idoneidad de aislar las fracciones bacterianas de referencia para la determinación del marcador microbiano, en cada circunstancia experimental, contrastan con el hecho de encontrar también en la bibliografía una gran variabilidad el valor de dicho parámetro.

La producción media de N microbiano, por kg de materia orgánica aparentemente digerida en rumen, para dietas mixtas que incluyen mas de un 50% de forraje ha sido estimada en ovino en 32 g y en 27 g cuando el forraje se encuentra en menor proporción (ARC, 1984). El valor propuesto por el INRA es de 23,2 g N/kg materia orgánica realmente fermentada en rumen. En ninguno de los dos experimentos realizados *in vivo* (**publicaciones 1 y 2**) la eficiencia de síntesis de la proteína microbiana, expresada en dichas unidades (**Tabla 5.4**), se aproximaba a los valores propuestos. Los valores medios de eficiencia de síntesis de proteína microbiana para el exp. 1 y dieta control varían entre 41,1 y 55,4 g de N/Kg de MO aparentemente digerida en rumen, en función de la fracción bacteriana elegida.

En el exp. 2 (**publicación 2**) la eficiencia de síntesis de N microbiano variaba entre 35 y 69 g de N/Kg de MO aparentemente digerida en rumen, en función de la dieta y de la fracción bacteriana considerada. La sobreestimación de la eficiencia de síntesis microbiana puede deberse a una sub-estimación de la relación BP:N en las fracciones bacterianas aisladas cuando estas están contaminadas con partículas del alimento (Obispo y Dehority, 1999).

**Tabla 5.4.** Excreción de derivados púricos en orina y eficiencia de producción de N microbiano en cabras en mantenimiento con las dietas experimentales. Datos no mostrados en el experimento 1 (publicación 1).

|  | Dietas <sup>1</sup> |                     |                    |                  | P-valor |
|--|---------------------|---------------------|--------------------|------------------|---------|
|  | AC                  | ACBI                | ACBII              | EEM <sup>2</sup> |         |
| DP en orina, $\mu$ moles/día                                   | 6.504 <sup>a</sup>  | 5.690 <sup>ab</sup> | 4.660 <sup>b</sup> | 143              | 0,02    |
| Eficiencia de la síntesis microbiana, g N/kg MODR <sup>3</sup> |                     |                     |                    |                  |         |
| BAS <sup>4</sup>   | 55,4 <sup>a</sup>   | 31,5 <sup>b</sup>   | 27,1 <sup>b</sup>  | 2,4              | <0,001  |
| BAL <sup>5</sup>   | 41,1 <sup>a</sup>   | 24,4 <sup>b</sup>   | 28,3 <sup>b</sup>  | 1,9              | <0,001  |
| Media de BAS y BAL <sup>6</sup>                                | 48,3 <sup>a</sup>   | 28,0 <sup>b</sup>   | 27,6 <sup>b</sup>  | 2,2              | <0,001  |

<sup>a,b</sup> Superíndices distintos en la misma fila indican diferencias significativa ( $P < 0,05$ )

<sup>1</sup> AC: 600 g heno de alfalfa y 400 g concentrado; ACBI: 600 g heno de alfalfa, 200 g concentrado y 180±80 g bloque I; ACBII: 600 g heno de alfalfa, 200 g concentrado y 291±61 g bloque II, en base a la materia fresca,

<sup>2</sup> Error estándar de la media

<sup>3</sup> MODR = materia orgánica degradable en rumen (MO digestible ingerida x 0,65)

<sup>4</sup> Bacterias asociadas a sólido

<sup>5</sup> Bacterias asociadas a líquido

<sup>6</sup> Valor medio de BAL y BAS

Otras posibles causas de la subestimación del valor BP:N podrían ser la lisis bacteriana durante el aislamiento de las fracciones (Reynal *et al.*, 2005), que implicaría una salida de purinas desde el citoplasma (Martín-Orúe *et al.*, 1998; Carro y Miller, 2002); degradación parcial de la adenina y guanina a sus metabolitos xantina e hipoxantina (Reynal y Broderick, 2005), no cuantificados por el método analítico seguido en el presente trabajo (Balcells *et al.*, 1992); una baja recuperación de las purinas contenidas en la fracción bacteriana durante el proceso de extracción por hidrólisis (Makkar y Becker, 1999; Obispo y Dehority, 1999). Los resultados parecen indicar que, además de conducir a una subestimación, esos factores podrían contribuir a la variabilidad en el valor BP:N observada en nuestros ensayos. Por último, un estudio reciente (Reynal y Broderick, 2009) ha propuesto un método alternativo de análisis de las bases púricas mediante HPLC para evitar la coelución de la guanina con los metabolitos de las purinas (xantina e hipoxantina) encontrada por otros autores en algunas muestras de bacterias y digesta (Reynal y Broderick, 2005) cuando se lleva a cabo el análisis mediante otros métodos que utilizan HPLC (Balcells *et al.*, 1992; Makkar y Becker, 1999).

Variaciones en los valores del cociente BP/N de las bacterias aisladas determinan que el FNM no presente un patrón de respuesta a los tratamientos similar al de la excreción urinaria de DP, lo que podría indicar errores en el aislamiento y/o análisis del contenido en purinas de las fracciones bacterianas. Teniendo en cuenta únicamente los datos de excreción de DP en orina se observa que la reducción de la cantidad de concentrado en la dieta no afectó este parámetro cuando el contenido y la degradabilidad del N del sustituto del concentrado fue parecida a la de este.

### **5.2.3. Digestibilidad y balance de nutrientes**

Previamente a la realización del ensayo *in vivo* del exp. 2, se llevaron a cabo incubaciones *in vitro* de los ingredientes de las dietas, con objeto de determinar su digestibilidad y estimar, a partir de ella, el contenido en energía metabolizable (ARC, 1984). Con esta información se formularon dietas isoenergéticas que se suministraron en cantidad suficiente para cubrir el 120% de los requerimientos energéticos de los animales en mantenimiento (Prieto *et al.*, 1990). La decisión de formular las dietas para cubrir un 120% de las necesidades de mantenimiento obedeció a un doble criterio: 1) tener en cuenta el comportamiento alimenticio selectivo de la cabra (Morand-Fehr, 1991; Narjissé, 1991) y, 2) corregir una posible subestimación del valor energético de las dietas a partir de los valores de digestibilidad *in vitro* de sus ingredientes. Los animales que consumían tres de las cuatro dietas experimentales (GC, AF y AC) tuvieron ingestas superiores a la correspondiente a sus necesidades energéticas de mantenimiento, lo que se tradujo en un incremento de peso (> 1 kg) durante las 3 semanas que duró cada ensayo, lo que sugería que la estimación de la composición en EM de los ingredientes fue relativamente fiable y que la situación de mantenimiento energético no se cumplió estrictamente. Además, observando los datos de la **Tabla 5.5** parece existir cierta relación entre el porcentaje de la dieta consumido por encima de mantenimiento y la ganancia de peso de los animales que las consumían. A pesar de que, como se ha comentado anteriormente, el heno de alfalfa puede sustituir parte del concentrado (dieta AF vs. AC) sin provocar cambios significativos en los parámetros de la fermentación ruminal (pH,

concentraciones de AGV y N amoniacal y síntesis de proteína microbiana), los resultados relativos a la digestibilidad de la MO y de la energía apuntan en sentido contrario. La digestibilidad aparente de la MO, en consonancia con otros trabajos realizados en caprino (Cerrillo *et al.*, 1999; Islam *et al.*, 2000; Tovar-Luna *et al.*, 2007), aumentó significativamente cuando las dietas contenían mayores proporciones de concentrado, independientemente del tipo de forraje utilizado.

**Tabla 5.5.** Datos complementarios relativos al ensayo *in vivo* del exp. 2

|                                      | Dietas <sup>1</sup> |                     |                     |                     | EEM <sup>2</sup> |
|--------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|
|                                      | GF                  | GC                  | AF                  | AC                  |                  |
| Observaciones, n                     | 4                   | 4                   | 4                   | 4                   |                  |
| Peso inicial <sup>3</sup> , Kg       | 47,6                | 46,5                | 45,3                | 46,0                | 0,41             |
| Peso final <sup>3</sup> , Kg         | 48,2                | 47,6                | 46,4                | 47,5                | 0,54             |
| Ganancia, Kg                         | 0,60 <sup>a</sup>   | 1,10 <sup>ab</sup>  | 1,10 <sup>ab</sup>  | 1,50 <sup>b</sup>   | 0,094            |
| Peso medio <sup>3</sup> , Kg         | 47,9                | 46,9                | 45,8                | 46,8                | 0,49             |
| EM dieta <sup>4</sup> , KJ/g MS      | 9,40 <sup>a</sup>   | 10,2 <sup>b</sup>   | 9,61 <sup>a</sup>   | 10,3 <sup>b</sup>   | 0,11             |
| EM <sub>m</sub> <sup>5</sup> , KJ/d  | 8.066               | 7.939               | 7.800               | 7.927               | 59               |
| MS ofrecida, g/d                     | 1029 <sup>b</sup>   | 934 <sup>a</sup>    | 974 <sup>b</sup>    | 924 <sup>a</sup>    | 4,4              |
| MS ingerida, g/d                     | 845 <sup>a</sup>    | 825 <sup>a</sup>    | 874 <sup>ab</sup>   | 917 <sup>b</sup>    | 9,3              |
| ED ingerida, KJ/d                    | 10.391 <sup>a</sup> | 11.586 <sup>b</sup> | 10.833 <sup>a</sup> | 12.354 <sup>c</sup> | 103              |
| EM ingerida <sup>6</sup> , KJ/d      | 7.943 <sup>a</sup>  | 8.448 <sup>b</sup>  | 8.399 <sup>b</sup>  | 9.481 <sup>c</sup>  | 94               |
| % mantenimiento <sup>7</sup>         | 98,5 <sup>a</sup>   | 106 <sup>a</sup>    | 108 <sup>ab</sup>   | 119 <sup>b</sup>    | 1,9              |
| MO ingerida, g/d                     | 782 <sup>a</sup>    | 758 <sup>a</sup>    | 784 <sup>a</sup>    | 826 <sup>b</sup>    | 12               |
| MODI <sup>8</sup> , g/d              | 531 <sup>a</sup>    | 615 <sup>b</sup>    | 541 <sup>a</sup>    | 636 <sup>b</sup>    | 5,4              |
| N ingerido, g/d                      | 16,4 <sup>a</sup>   | 20,9 <sup>ab</sup>  | 26,9 <sup>b</sup>   | 28,3 <sup>b</sup>   | 1,9              |
| N retenido, g/d                      | 1,27 <sup>a</sup>   | 3,94 <sup>b</sup>   | 5,31 <sup>c</sup>   | 4,83 <sup>bc</sup>  | 0,26             |
| N retenido, mg/Kg <sup>0.75</sup> /d | 69,7 <sup>a</sup>   | 220 <sup>b</sup>    | 302 <sup>b</sup>    | 270 <sup>b</sup>    | 22               |

<sup>a-c</sup> medias con distinto superíndice difieren,  $P < 0,05$ .

<sup>1</sup> GF = 70% heno de gramíneas + 30% concentrado; GC = 30% heno de gramíneas + 70% concentrado; AF = 70% heno de alfalfa + 30% concentrado; AC = 30% heno de alfalfa + 70% concentrado

<sup>2</sup> Error estándar de la media

<sup>3</sup> Error de pesada  $\pm 100$  g

<sup>4</sup> Calculada como MO x Digestibilidad *in vitro* MO x 19 x 82 (ARC, 1980)

<sup>5</sup> Energía metabolizable de mantenimiento = 443 KJ EM/Kg<sup>0.75</sup>/día (Prieto *et al.*, 1990)

<sup>6</sup> Calculada como la EM de la dieta x MS ingerida y asumiendo que no existe selección de ingredientes.

<sup>7</sup> % que representa la EM ingerida respecto a la EM de mantenimiento (EM<sub>m</sub>)

<sup>8</sup> Materia orgánica digestible ingerida

Tanto el INRA (1988) como el NRC (1989) definen la energía metabolizable (EM) como la energía potencialmente utilizable por los tejidos del organismo para mantenimiento, crecimiento o producción, que se calcula trayendo a la energía digestible la energía de la orina y del metano producido

en las fermentaciones del rumen. Puesto que la producción de metano no se determinó en el presente trabajo, la ingesta de EM de los animales se estimó a partir de la EM de los ingredientes de la ración y de la cantidad de dieta ingerida, y asumiendo que en la dieta mixta no se seleccionaban los ingredientes puesto que fueron consumidos prácticamente en su totalidad. La ingesta de la EM estimada fue numéricamente menor para la dieta GF, intermedia para las dietas GC y AF, y mayor para AC. Parece que, a pesar de que las dietas se formularon para aportar la misma cantidad de EM, el hecho de que unas dietas fueran más apetecibles que otras hizo que el consumo de energía por algunos animales estuviera ligeramente por encima de sus necesidades de mantenimiento, en consonancia con resultados encontrados por otros autores en caprino en mantenimiento (Molina-Alcaide *et al.*, 2000; Tovar-Luna *et al.*, 2007). Las distintas dietas aportaron cantidades de N diferentes y, en todos los casos, estaban muy por encima de las necesidades de mantenimiento del ganado caprino (Reynolds, 1981; Prieto *et al.*, 1990).

El balance de nutrientes permite confirmar el estado de mantenimiento de los animales experimentales o, en su caso, la ganancia o pérdida de peso. Los datos del balance de N del exp. 2 (**publicación 2**) muestran que, independientemente de la forma en que se exprese, las dietas GC, AF y AC presentaban valores similares de eficiencia de utilización del N, lo que podría sugerir que un aumento del concentrado tiene solo efectos en las dietas que utilizan el heno de gramíneas como forraje. No obstante, puesto que las condiciones de mantenimiento energético no se han cumplido estrictamente y los animales presentaban ligeras ganancias de peso, diferentes según la dieta, los datos de la eficiencia de utilización del N han de considerarse con cautela y analizarse junto a la ingesta de EM, por encima de mantenimiento para los distintos tratamientos. Si previamente se comentaba la relación existente entre la ingesta de EM por encima de mantenimiento y las ganancias de peso obtenidas, parece, como es lógico, que dicha relación también puede aplicarse a la retención de N. Algunos autores han encontrado una retención positiva de N en animales que, supuestamente, se alimentaban a nivel de mantenimiento energético (Pralomkarn *et al.*, 1995; Yáñez-Ruiz y Molina-Alcaide, 2007) o ligeramente por debajo de éste (Islam *et al.*, 2000). Este hecho parece difícil de explicar si se considera que el estado no productivo de un animal es

incompatible con la deposición de proteína, y parece más bien reflejar situaciones (Chandramoni *et al.*, 2000) como la encontrada en nuestro caso, o retenciones de N positivas (Fujita *et al.*, 2006) o negativas (Yáñez-Ruiz y Molina-Alcaide, 2007) pero sin significado biológico importante. Los valores de deposición de N, encontrados en los ensayos *in vivo* que se incluyen en esta memoria, son similares a los obtenidos en cabras u ovejas alimentadas a un nivel “próximo a mantenimiento” (Chandramoni *et al.*, 2000; Yáñez-Ruiz y Molina-Alcaide, 2007), con dietas similares, aunque superiores a las referidas en otros trabajos (Fujita *et al.*, 2006). La excreción de N en orina en el presente estudio sigue la misma tendencia que su ingesta y es, en general, elevada debido a que los aportes de N eran superiores a las necesidades descritas para animales en mantenimiento (Prieto *et al.*, 1990). El perjuicio potencial para el medio ambiente, derivado de la excreción de N en orina, que se asocia al consumo de estas dietas, disminuiría en animales en producción con altas demandas en N degradable.

Los datos relativos a la digestibilidad de la MO son de gran importancia práctica, quedando demostrado que las ventajas que ofrece aumentar el concentrado en la dieta se extiende a ambos forrajes utilizados. Desde un punto de vista productivo parece que los resultados sugieren utilizar dietas con un 70% de concentrado (GC y AC) frente a aquellas con un 30% (GF y AF), por el mero hecho de ser más densas energéticamente (EM/Kg de MS) y poder contribuir así a una mayor ingesta de EM, en situaciones de ingesta limitada, características del inicio de la lactación (Sporndly, 1989). Sin embargo, las conclusiones obtenidas por Lefrileux *et al.* (2008) en una revisión de varios estudios en los que se administraron diferentes cantidades de concentrado como suplemento del pasto en caprino en lactación, difieren de lo observado en el presente estudio, probablemente porque la calidad del forraje utilizado en cada uno de esos estudios fue superior a la del empleado en nuestras condiciones, especialmente en lo que a digestibilidad de la MO se refiere. Por último, mencionar que las ventajas que supondría la utilización de dietas mixtas con una baja relación F:C en animales de alta producción queda supeditado a la ausencia de interacciones digestivas negativas entre el forraje y el concentrado en el caso de obtener un pH ruminal ácido, como consecuencia de un aporte elevado de concentrado.

Una disminución de la cantidad de concentrado en dietas mixtas implica una reducción significativa de la digestibilidad de su MO en ganado caprino y, por tanto, un descenso en la densidad energética (EM) de dicha ración, independientemente de que el forraje utilizado sea heno de gramíneas o heno de alfalfa. Este hecho podría representar una desventaja de la aplicación de ambas estrategias en ganado caprino de alta producción.

## **CAPÍTULO 6**

### **Conclusiones**

*Conclusions*





## 6.1. Conclusiones

Teniendo en cuenta los objetivos abordados y los resultados obtenidos se pueden establecer las siguientes conclusiones:

### **Primera**

Los valores absolutos, que se obtienen en fermentadores de flujo continuo simple y en el rumen de caprino, son diferentes para la mayor parte de los parámetros de la fermentación ruminal. Sin embargo, el patrón de respuesta a los diferentes tratamientos, obtenido *in vivo*, se reproduce adecuadamente en los fermentadores de flujo continuo simple para gran parte de los parámetros de la fermentación ruminal y la síntesis de proteína microbiana, siempre que los valores de pH *in vitro* sean comparables al pH del rumen.

### **Segunda**

El potencial simulador de los fermentadores de flujo continuo simple depende de la relación entre la cantidad de alimento suministrado y la cantidad de saliva infundida así como de la calidad de la dieta, y más concretamente del tipo de forraje utilizado. Las diferencias encontradas *in vivo* entre dietas con alto y bajo contenido en concentrado se simulan adecuadamente con estos sistemas *in vitro*.

### **Tercera**

La estructura de las comunidades bacterianas, establecidas en los fermentadores de flujo continuo simple y en el rumen, es diferente. Probablemente estas diferencias determinan las observadas en algunos parámetros de la fermentación ruminal y la composición química de las fracciones bacterianas, utilizadas como referencia para la estimación de la síntesis de proteína microbiana.

### **Cuarta**

La microbiota que se desarrolla en los fermentadores de flujo continuo simple puede tener una funcionalidad parecida a la que se establece en el rumen de caprino, dado que tanto la biomasa como la diversidad en especies bacterianas resulta parecida en ambos ecosistemas y, que la capacidad de estos

fermentadores para detectar diferencias entre tratamientos sobre las comunidades bacterianas es similar a la que se produce *in vivo*.

### **Quinta**

La sustitución parcial del concentrado por bloques multinutrientes no reduce significativamente la fermentación ruminal de los carbohidratos. Además, cuando el concentrado se sustituye por el bloque multinutriente que incluye la mayor cantidad de alperujo no se reduce significativamente la excreción urinaria de derivados púricos.

### **Sexta**

Cuando la sustitución parcial del concretado se realiza utilizando forrajes su efecto sobre los parámetros de la fermentación ruminal depende de la calidad del forraje utilizado, no siendo significativo en aquellos casos en los que se utiliza heno de alfalfa. Sin embargo, la digestibilidad aparente total de la materia orgánica de la dieta disminuye, independientemente del tipo de forraje.

---

*Based on the initial aims and the results obtained in this work, we can conclude:*

### **First**

*The values obtained in continuous culture fermenters and in the goats rumen differ in number for most of the studied fermentation parameters. However, the response pattern to different experimental treatments found in vivo is adequately simulated in single-flow continuous-culture fermenters for most of the rumen fermentation parameters as long as pH in the fermenters remains within the same range as in vivo.*

### **Second**

*The simulation ability of single-flow continuous-culture fermenters depends very much on the diet input/saliva ratio and on the quality of the diet, specially the type of forage. The differences observed in vivo with regards to the level of concentrate are well simulated by the in vitro system.*

**Third**

*The structure of the microbial communities establishing in the rumen and in single-flow continuous-culture fermenters is different. This could probably explain the disagreement reported in some fermentation parameters and in the chemical composition of the bacterial fractions used as reference for estimating the microbial protein synthesis.*

**Fourth**

*The microbial population maintained in the single-flow continuous-culture fermenters seems to have a similar functionality to the one established in the goats rumen since both the diversity and total biomass are similar in both ecosystems and that single-flow continuous-culture fermenters detect differences between treatments upon bacterial groups similarly to that observed in vivo.*

**Fifth**

*The partial substitution of the concentrate by feed blocks does not significantly reduce the rumen fermentation of carbohydrates. When the feed block includes the highest proportion of olive cake, the urinary excretion of purine derivatives is not affected either.*

**Sixth**

*When the use of concentrate in the diet is reduced by supplying more forage, the effects on the rumen fermentation parameters are very much depending on the nutritive quality of the forage, being non significant when alfalfa hay is used. However, the organic matter digestibility of the diet is reduced regardless the type of forage used.*



## **CAPÍTULO 7**

**Resumen**

*Abstract*



### 7.1. Resumen / Abstract

En este trabajo se evalúa, comparativamente, el efecto de reemplazar una parte del concentrado en la dieta sobre la fermentación ruminal y la digestibilidad de los nutrientes así como, sobre la estructura, tamaño, diversidad y composición química de las comunidades bacterianas, en ganado caprino y en fermentadores de flujo continuo simple (**FFCS**). La sustitución parcial del concentrado en la dieta se ha abordado mediante dos estrategias: i) utilización de bloques multinutrientes, que incorporan materias primas autóctonas, entre ellas un subproducto de la extracción del aceite de oliva (**experimento 1**), y; ii) aumento de la relación forraje:concentrado (**F:C**) en dietas mixtas, utilizando heno de gramíneas o de alfalfa (**experimento 2**). Los tratamientos del exp. 1 consistían en una dieta control (dieta **AC**), basada en heno de alfalfa (60%) y concentrado (40%) y, dos dietas en las que la cantidad de concentrado se reducía a la mitad, en comparación con la dieta AC, y se incluían bloques multinutrientes, denominados I y II (dietas **ACBI** y **ACBII**, respectivamente). Las tres dietas se suministraron a 6 cabras de raza granadina ( $46,9 \pm 2,2$  kg de peso vivo) y 6 FFCS en 3 períodos consecutivos y siguiendo un diseño experimental en cuadrado latino 3 x 3 replicado, de forma que, tanto *in vivo* como *in vitro*, cada dieta se analizó en un total de 6 unidades experimentales, dos por período. En los ensayos *in vivo* la dieta AC se formuló para cubrir las necesidades de mantenimiento energético de los animales, mientras que en las dietas ACBI y ACBII los bloques multinutrientes se administraron ad libitum. En los ensayos *in vitro*, la dieta AC, al igual que en los ensayos *in vivo*, estaba constituida por heno de alfalfa y concentrado en una proporción de 60:40; las dietas ACBI y ACBII contenían heno de alfalfa, concentrado y el bloque multinutriente correspondiente en la proporción 60:20:20. La cantidad de dieta aportada a cada fermentador era de 75 g de materia fresca al día.

En el exp. 2 los tratamientos consistían en 4 dietas, constituidas por heno de gramíneas (**G**) o heno de alfalfa (**A**) y concentrado, de forma que la relación forraje:concentrado fuese 70:30 (**F**) o 30:70 (**C**). Las dietas, denominadas como **GF**, **GC**, **AF** y **AC**, se ensayaron siguiendo un factorial 2 x 2, dentro de un diseño experimental en cuadrado latino 4 x 4. Todas las dietas se formularon para cubrir el 120% de las necesidades energéticas de mantenimiento de las 4



cabras de raza granadina ( $46,3 \pm 3,0$  kg de peso vivo) utilizadas en los ensayos *in vivo*. En los ensayos *in vitro* se utilizaron 8 FFCS. Dos fermentadores recibían cada una de las dietas experimentales, uno 30 g de materia seca (**MS**) y el otro 45 g de MS, con objeto de establecer la influencia de dos rangos de valores de pH diferentes sobre el potencial simulador de los FFCS. El diseño experimental del ensayo *in vitro* correspondió a dos cuadrados latinos 4 x 4 independientes con un ordenamiento de los tratamientos estudiados similar al del ensayo *in vivo*. Cada uno de los periodos del ensayo *in vitro* se iniciaba al finalizar el correspondiente período *in vivo*. El líquido ruminal, extraído de cada animal (exp. 2) o pareja de animales (exp. 1) alimentados con la misma dieta, se utilizó como inóculo de dos fermentadores a los que se suministraba la misma dieta que recibían el animal o animales donadores de su inóculo.

Los resultados del exp. 1 muestran, tanto *in vivo* como *in vitro*, que la sustitución parcial del concentrado, en dietas mixtas, por bloques multinutrientes no afectó a la fermentación ruminal de los carbohidratos, ya que la concentración o producción de ácidos grasos volátiles (**AGV**) en el rumen y en el fermentador, respectivamente, era similar para todas las dietas estudiadas ( $P \geq 0,35$ ). Además, la sustitución de la mitad del concentrado por el bloque II (dieta AC vs. ACBII) no redujo ( $P > 0,05$ ) la síntesis de proteína microbiana, medida como flujo de bases púricas (**BP**) al duodeno. Los datos *in vivo*, obtenidos en este experimento, apuntan a la posibilidad de utilizar bloques multinutrientes para sustituir una parte del concentrado de la dieta de ganado caprino en mantenimiento, sin que la fermentación ruminal se vea comprometida. Por otro lado, en este experimento se observaron diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) entre los valores absolutos, obtenidos *in vivo* e *in vitro*, para la mayor parte de los parámetros de la fermentación y para la composición química de las fracciones bacterianas. Sin embargo, las respuestas al efecto de la dieta de la mayor parte de las variables analizadas *in vivo*, incluyendo la relación BP:N de las diferentes fracciones bacterianas utilizadas para la estimación del flujo de N microbiano, se reproducían adecuadamente en los FFCS (interacción origen de la muestra x dieta,  $P \geq 0,05$ ). En aquellos casos en los que las tendencias observadas *in vivo* e *in vitro* no eran similares, como la proporción molar de ácido propiónico y una serie de parámetros relacionados con la síntesis de proteína microbiana, las diferencias

pueden deberse a los distintos valores de pH encontrados en el rumen y en los fermentadores (interacción origen x dieta,  $P = 0,003$ ).

Los resultados correspondientes al ensayo *in vivo* del exp. 2 muestran que la mayor parte de los nutrientes de las dietas ricas en concentrado (GC y AC) presentaban una mayor ( $P < 0,001$ ) digestibilidad aparente y número total de protozoos en el rumen, en comparación con aquellas dietas ricas en forraje. Sin embargo, la digestibilidad aparente de la proteína, la concentración de N-amoniaco en el rumen y la síntesis de proteína microbiana, medida como excreción urinaria de derivados púricos (**DP**), aumentaban al cambiar la relación F:C de 70:30 a 30:70, únicamente con las dietas basadas en heno de gramíneas (interacción tipo de forraje x relación F:C,  $P \leq 0,08$ ). Por otra parte, las dietas ricas en concentrado promovían menores ( $P < 0,001$ ) valores de pH en el rumen, en relación a aquellas con alta proporción de forraje, sin afectar ( $P = 0,12$ ) a la concentración media de AGV totales. Los valores del flujo de N microbiano, estimados a partir de la excreción de DP en orina, eran muy superiores cuando se utilizó la relación BP:N de las fracciones bacterianas aisladas en nuestras condiciones experimentales que cuando se empleaba el valor fijo del cociente BP:N propuesto en la bibliografía para pequeños rumiantes. Los resultados encontrados en este ensayo *in vivo* indican que aunque los parámetros relacionados con el metabolismo del N no se modificaron al aumentar la relación F:C de 30:70 a 70:30 con dietas basadas en heno de alfalfa, el menor contenido en energía digestible de las dietas ricas en forraje podría limitar su uso en animales de alta producción. Los valores medios de pH, obtenidos en los fermentadores del exp. 2 que recibían 30 g de MS (6,22 – 6,53), eran superiores ( $P < 0,001$ ) a los que se observaron en los fermentadores que recibían 45 g de MS diarios (5,70 – 6,08). En los primeros, además, los valores de pH mostraban un rango más cercano al de los valores encontrados en el rumen de caprino alimentado con las mismas dietas (6,22 – 6,43). Los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* del exp. 2 explican algunas discrepancias *in vivo* – *in vitro* observadas en el exp. 1: bajos valores del pH en fermentadores, asociados con un aporte más elevado de MS, hacen que la simulación de la respuesta *in vivo* de algunas variables a los tratamientos no sea adecuada. Así, la digestibilidad de los nutrientes, especialmente la de la fibra neutro detergente, y algunos parámetros de la

fermentación ruminal como el pH, la concentración de AGV y el flujo de BP no se simularon correctamente en aquellos fermentadores que recibían 45 g MS de la dieta por fermentador y día, mientras que en los que recibían 30 g MS si se observó una adecuada simulación de las respuestas a los tratamientos que se producían en el animal. Sin embargo, los primeros permitían simular la evolución temporal de los 3 parámetros de la fermentación analizados (pH y concentración de AGV y N amoniacal), observada *in vivo* (interacción dieta x origen x tiempo,  $P \geq 0,18$ ).

Los FFCS alimentados con 30 g de MS diarios, cuyos valores de pH eran próximos a los del rumen de animales alimentados con las mismas dietas, simularon adecuadamente la respuesta de la mayor parte de los parámetros estudiados cuando se disminuyó la cantidad de concentrado en la dieta. En aquellos casos en los que no se observó un mismo patrón de respuesta *in vivo* e *in vitro*, como la digestibilidad aparente de los carbohidratos no fibrosos y la relación acético:propiónico, la incapacidad de los FFCS para simular lo que ocurría en el animal solo se manifestaba con las dietas ricas en forraje (GF y AF). Este hecho coincide con la observación de que el efecto *in vivo* del tipo de forraje utilizado sobre varios de los parámetros estudiados no se reprodujo adecuadamente en los FFCS, independientemente de que sus valores de pH fueran o no cercanos a los del rumen.

Las diferencias en cuanto a la composición química de las fracciones bacterianas, aisladas a partir de muestras de contenido ruminal y de los FFCS, observadas en ambos experimentos, indican una estructura distinta de las comunidades bacterianas presentes en ambos ecosistemas. Mediante dos técnicas moleculares, polimorfismo en la longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP) y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR), se comprobó que si bien la diversidad y el tamaño de las comunidades bacterianas del contenido de los FFCS, cuyo pH era superior a 6,0, no diferían ( $P \geq 0,05$ ) de las establecidas en el rumen de caprino alimentado con las mismas dietas, su estructura era diferente. El análisis discriminante de las especies presentes en las fracciones bacterianas asociadas a las fases sólida y líquida del contenido del rumen y del vaso del fermentador, indica una estructura bacteriana más parecida cuando la dieta suministrada a los animales y a los fermentadores era la misma que cuando no lo era. Los resultados

obtenidos, mediante la aplicación de técnicas moleculares, sugieren que las diferencias *in vivo* – *in vitro*, encontradas para algunos parámetros de la fermentación ruminal, se deben a una distinta composición de ambos ecosistemas en especies bacterianas. Sin embargo, la biomasa y diversidad de las bacterias de ambos ecosistemas eran parecidas, lo que puede indicar que en los FFSC se establece una microbiota cuya funcionalidad es suficientemente parecida a la del rumen como para detectar diferencias entre tratamientos similares a las encontradas en el rumen de caprino.

Los resultados de este trabajo muestran la utilidad de los fermentadores de flujo continuo simple para estudiar el efecto de distintos tratamientos sobre el metabolismo ruminal del ganado caprino. La calidad de la simulación que los fermentadores proporcionan depende de que la relación entre la cantidad de dieta suministrada a los fermentadores y la de saliva infundida permita que el pH de los fermentadores sea lo más próximo posible al del rumen. El potencial simulador de estos fermentadores con dietas mixtas forraje-concentrado depende de la calidad del forraje. El uso de bloques multinutrientes permite la inclusión de un subproducto, con un elevado contenido en humedad, en dietas para rumiantes en mantenimiento sin comprometer la fermentación ruminal. La sustitución parcial del concentrado por un forraje de buena calidad como el heno de alfalfa tampoco compromete la fermentación ruminal.

---

*In this work the effect of replacing part of the concentrate in the diet on rumen fermentation and nutrient digestibility as well as on the structure, size, diversity and chemical composition of bacterial communities has been evaluated comparatively in goats and in single-flow continuous-culture fermenters (SFCCF). The partial substitution of concentrate in the diet has been addressed by two strategies: i) by using feed blocks incorporating local feedstuffs, including a byproduct of the olive oil extraction (experiment 1), and; ii) by increasing the forage: concentrate ratio (F:C) in diet using grass or alfalfa hay (experiment 2). The treatments of exp. 1 consisted of a control diet (diet AC) based on alfalfa hay (60%) and concentrate (40%) and two diets in which the amount of concentrate was reduced including feed blocks, so called I and II (ACBI and ACBII diets, respectively). The three diets were fed to 6 Granadina*

goats ( $46.9 \pm 2.2$  kg body weight) and 6 SFCCF over 3 consecutive periods and according to a 3 x 3 Latin square replicated experimental design. Both *in vivo* and *in vitro*, the effect of each diet was analyzed in 6 experimental units, two per treatment. Diet AC was formulated to meet the energy requirements for maintenance of the animals, while in diets ACBI and ACBII feed blocks were offered *ad libitum*. In the *in vitro* trial the AC diet was made in the same manner as that used *in vivo* (alfalfa hay and concentrate, 60:40) while for diets ACBI and ACBII alfalfa hay, concentrate and the corresponding feed block were included in a 60:20:20 ratio. The amount of diet provided to each fermenter was 75 g of fresh matter per day.

In exp. 2, treatments consisted of 4 diets based on grass (**G**) or alfalfa (**A**) hay and concentrate so that the forage: concentrate ratio was 70:30 (**F**) or 30:70 (**C**). Diets, known as **GF**, **GC**, **AF** and **AC** were tested using a 2 x 2 factorial within a 4 x 4 Latin square design. All the diets were formulated to meet 120% of maintenance energy requirements for Granadina goats ( $46.3 \pm 3.0$  kg body weight). In the *in vitro* trial 8 SFCCF were used, receiving either 30 or 45 g of dry matter (DM) daily in order to study the simulating potential of SFCCF by using two different ranges of pH values. The experimental design of the *in vitro* assay corresponded to two independent 4 x 4 Latin squares. Each period within the *in vitro* trial began at the end of the corresponding period *in vivo*. Rumen fluid, taken from each animal (Exp. 2) or pair of animals fed the same diet (Exp. 1) was used as inoculum for two fermenters that received the same diet fed to donor animals.

The results of exp. 1 show, both *in vivo* and *in vitro*, that the partial substitution of concentrate in diets with multinutrient blocks did not affect ruminal fermentation of carbohydrates as the volatile fatty acids (**VFA**) concentration and production in the rumen and fermenters, respectively, were similar ( $P \geq 0.35$ ). Furthermore, replacement of half of the concentrate by the block II (AC vs. ACBII) did not reduce ( $P \geq 0.05$ ) microbial protein synthesis, measured as daily purine bases (**PB**) flow. The *in vivo* data obtained in this experiment suggest the possibility of using multinutrient blocks to replace a portion of concentrate in the diet of goats without compromising the ruminal fermentation. Moreover, in this experiment there were significant differences ( $P < 0.001$ ) between the absolute values obtained *in vivo* and *in vitro* for most of

the fermentation parameters and chemical composition of the bacterial fractions. However, responses to the effect of the diet of most of the variables analyzed *in vivo*, including the PB:N of the different bacterial fractions used to estimate microbial N flow, were well reproduced in SFCCF (origin x diet interaction,  $P \geq 0.05$ ). In cases the trends observed *in vivo* and *in vitro* were similar (molar proportion of propionic acid and parameters related to microbial protein synthesis) differences can be due to the different pH values (source x diet interaction,  $P = 0,003$ ).

The results from the *in vivo* assay in exp. 2 show that animals fed rich concentrate diets (AC and GC) had higher ( $P < 0.001$ ) apparent digestibility and total protozoa numbers in the rumen, compared with those fed rich-forage diets. However, the apparent digestibility of crude protein, N-ammonia concentration in the rumen and microbial protein synthesis, measured as urinary excretion of purine derivatives (**PD**), increased by changing the ratio F:C from 70:30 to 30:70, only with diets based on grass hay (forage type x F:C ratio interaction,  $P \leq 0.08$ ). Moreover, rich-concentrate diets promoted lower ( $P < 0.001$ ) pH values in the rumen, in relation to those with a high proportion of forage for which the average concentration of total VFA was not affected ( $P = 0.12$ ). The microbial N flow values, estimated from the PD excretion in urine, were much higher when using the PB:N ratios from the bacterial fractions isolated in our experimental conditions than when using the PB:N ratio provided by equations developed for small ruminants, which underlines the importance of analyzing that value in the fractions isolated in each particular experiment. The results found in this *in vivo* study indicate that although the parameters related to N metabolism were not affected by increasing the F:C ratio from 30:70 to 70:30 with diets based on alfalfa hay, the lower digestible energy content in forage rich diets may limit their use in high-producing animals. The average pH values obtained in fermenters of exp. 2 receiving 30 g DM (6.22 - 6.53) were higher ( $P < 0.001$ ) than those observed in the fermenters supplying 45 g DM per day (5.70 - 6.08). The former also showed a range of pH values closer to the pH values found in the rumen of goats fed the same diet (6.22 - 6.43). The results obtained in the *in vitro* assay of exp. 2 explain some discrepancies *in vivo* - *in vitro* observed in exp. 1: low pH values *in vitro*, associated with high inputs of DM, promoted an inadequate simulation in fermenters for some variables to treatments. Thus, the

*digestibility of nutrients, especially the neutral detergent fiber, and some rumen fermentation parameters such as pH, concentration of VFA and the PB flow were not simulated correctly in fermenters receiving 45 g DM of the diet. Fermenters receiving 30 g DM per fermenter and day showed a proper simulation of the responses to treatments that occurred in the animal. However, the first DM input allowed to simulate the daily pattern of the 3 fermentation parameters studied (pH and concentration of VFA and ammonia N), observed in vivo (origin x diet x time interaction,  $P \geq 0.18$ ). The SFCCF fed 30 g daily DM, whose pH values were close to those in the rumen of animals fed the same diets, adequately simulated the response of most of the parameters studied to the decreased amount of concentrate in the diet. In the cases the pattern of response in vivo and in vitro was not similar, such as the apparent digestibility of non fibrous carbohydrates and the acetic:propionic ratio, their inability to simulate what happens in the animal only existed with diets rich in forage (GF and AF). This agrees with the observation that the in vivo effect of the type of forage used on various parameters studied was not adequately replicated in SFCCF, regardless of their pH values were near or not to the values in the rumen.*

*The differences in chemical composition of the bacterial fractions isolated from rumen and SFCCF contents in both experiments suggest a different structure of bacterial communities in both ecosystems. Using two molecular techniques, terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and real-time polymerase chain reaction (qPCR), it was found that although the size and diversity of bacterial communities in SFCCF contents whose the pH was above 6.0 did not differ ( $P > 0.05$ ) from those in the rumen of goats fed the same diet, its structure was different. The discriminant analysis of the species present in the bacterial fractions associated to solid and liquid phases of rumen contents and the fermenter flask indicated a similar bacteria community structure if diet fed to animals and fermenters is the same. The results, obtained through the application of molecular techniques, suggest that differences in vivo - in vitro found for some parameters of rumen fermentation are due to a different composition of bacterial species in both ecosystems. However, biomass and diversity of bacteria were similar in both ecosystems, which may indicate that microorganisms established in SFCCF has a functionality that is similar enough to*

*detect differences between treatments in a similar way to what occur in the rumen of goat.*

*The results from this study show the usefulness of single-flow continuous-culture fermenters to study the effect of different treatments on the rumen metabolism in goats. The accuracy of the simulation provided by fermenters depends on the relationship between the amount of diet fed to fermenters and saliva infused, which allow the pH to be within the same range as in the rumen. The simulating potential of these fermenters with mixed forage-concentrate diets depends on the quality of forage. The use of multinutrient blocks allows for the inclusion of a product with high moisture content, in diets for ruminants at maintenance without compromising the rumen fermentation. The partial substitution of concentrate by good quality forage, such as alfalfa hay did not compromise rumen fermentation.*





## **CAPÍTULO 8**

### **Bibliografía**



## 8.1. Bibliografía

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. *Journal of Animal Science* 36:941-948.

Abe M., Kurihara Y. 1984. Long-term cultivation of certain rumen protozoa in a continuous fermentation system supplemented with sponge materials. *Journal of Applied Bacteriology* 56:201-213.

Abijaoudé J.A., Morand-Fehr P., Tessier J., Schmidely Ph., Sauvant D. 2000. Influence of forage: concentrate ratio and type of starch in the diet on feeding behaviour, dietary preferences, digestion, metabolism and performance of dairy goats in mid lactation. *Animal Science* 71:359-368.

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* C<sub>18:1</sub> positional isomers in continuous culture. *Journal of Dairy Science* 88:4334-43451.

Acinas S.G., Sarma-Rupavtarm R., Klepac-Ceraj V., Polz M.F. 2005. PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Applied and Environmental Microbiology* 71:8966-8969.

Adler J. H., Dye J.A., Boggs D.E., Williams H.H. 1958. Growth of rumen microorganisms in an *in vitro* continuous-flow system on a protein free diet. *Cornell Veterinarian* 48:53-66.

ADR-Nororma, 2001. Asociación para el desarrollo rural de la comarca nororiental de Málaga. <http://www.nororma.com>

AFRC, Agricultural and Food Research Council. 1998. *The Nutrition of Goats*. CAB International. Nueva York. 41-51.

Ahvenjärvi S., Vanhalato A., Huhtanen P. 2002. Supplementing barley or rapeseed meal to dairy cows fed grass-red clover silage: I. Rumen degradability and microbial flow. *Journal of Animal Science* 80:2176-2187.

Al-Khalidi U.A.S., Chaglassian T.H. 1965. The species distribution of xanthin oxidase. *Biochemical Journal* 97:318-320.

Alrahmoun W., Masson C., Tisserand J.L. 1986. Comparative study of the microbial activity in the rumen of goats and sheep. 2. Effect of the level and type of protein used. *Annales de Zootechnie* 35:109-120.

Amman R., Ludwig W., Schleifer K. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59:143-169.

Andersen J.B., Friggens N.C., Sejrsen K., Sørensen M.T., Munksgaard L., Ingvarsen K.L. 2003. The effects of low vs. high concentrate level in the diet on performance in cows milked two or three times daily in early lactation. *Livestock Production Science* 81:119-128.

Andrade H., Bernal G., Llamas G. 1996. Influence of different alfalfa:sorghum ratios in the diet of dairy goats on productivity and rumen turnover. *Small Ruminant Research* 21:77-82.

Andrade P.V.D., Schmidely Ph. 2006. Influence of percentage of concentrate in combination with rolled canola seeds on performance, rumen fermentation and milk fatty acid composition in dairy goats. *Livestock Science* 104:77-90.

Antoniewicz A.M. 1983. Allantoin in urine as indicator of rumen development in lambs. *Roczniki Naukowe Zootechniki* 10:181-190.

ARC, Agricultural Research Council. 1980. *The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock*. Technical Review, Farnham Royal: CAB.

Archimède H., Sauvant D., Dorleans M., Chapoutot P., Poncet, C. 1995. Influence of the nature of forage and concentrate on the digestive interactions measured in sacco and *in vivo*. *Animal Feed Science and Technology* 54:341-356.

Archimède H., Sauvant D., Hervieu J., Ternois F., Poncet C. 1996. Effects of the nature of roughage and concentrate and their proportion on ruminal characteristics of non lactating goats, consequences on digestive interactions. *Animal Feed Science Technology* 58:267-282.

Archimède H., Sauvant D., Schmidely P. 1997. Quantitative review of ruminal and total tract digestion of mixed diet organic matter and carbohydrates. *Reproduction Nutrition Development* 37:173-189.

Armentano L.E. 1992. Ruminant hepatic metabolism of volatile fatty acids, lactate and pyruvate. *Journal of Nutrition* 122:838-842.

Aregheore E.M. 2006. Utilization of concentrate supplements containing varying levels of copra cake (*Cocos nucifera*) by growing goats fed a basal diet of napier grass (*Pennisetum purpureum*). *Small Ruminant Research* 64:87-93.

Assmus B., Hutzler P., Kirchhofm G., Amann R., Lawrence J.R., Hartmann A. 1995. In situ localization of azospirillum brasilense in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rna-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1013-1019.

Atasoglu C., Newbold C.J., Wallace R.J. 2001. Incorporation of [<sup>15</sup>N] Ammonia by the Cellulolytic Ruminant Bacteria *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* SY3, and *Ruminococcus flavefaciens* 17. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2819-2822.

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. *Journal of Dairy Science* 82:153-160.

Bach A., Calsamiglia S., Stern M.D. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* 88:9-21.

Bach A., Ruiz Moreno M., Thrune M., Stern M.D. 2008. Evaluation of the fermentation dynamics of soluble crude protein from three protein sources in continuous culture fermenters. *Journal of Animal Science* 86:1364-1371.

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. *Journal of Agriculture Science* 116:309-317.

Balcells J., Guada J.A., Peiró J.M., Parker D.S. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 575:153-157.

Balcells J., Fondevila M., Guada J.A., Castrillo C., Surra J.C.E. 1993. Urinary excretions of purine derivatives and nitrogen in sheep given straw supplemented with different sources of carbohydrates. *Animal Production* 57:287-292.

Balch C.C. 1971. Proposal to use time spent chewing as an index of the extent to which diets for ruminants possess the physical property of fibrousness characteristic of roughages. *British Journal of Nutrition* 26:383-392.

Bannink A., Kogut J., Dijkstra J., France J., Kebreab E., Van Vuuren A.M., Tamminga S. 2006. Estimation of the stoichiometry of volatile fatty acid production in the rumen of lactating cows. *Journal of Theoretical Biology* 238: 36-51.

Bargo F., Muller L.D., Delahoy J.E., Cassidy T.W. 2002. Milk response to concentrate supplementation of high producing Dairy cows grazing at two pasture allowances. *Journal of Dairy Science* 85:1777-1792.

Bates D.B., Gillett J.A., Barao S.A., Bergen W.R. 1985. The effect of specific growth rate and stage of growth on nucleic acid-protein values of pure cultures and mixed ruminal bacteria. *Journal of Animal Science* 61:713-724.

Bato R.V., Sevilla C.C., 1988. Plant preference and diet selectivity of goats in three diets. *Philippine Agriculturist* 71:229-239.

Beauchemin K.A., Yang W.Z., Rode L.M. 2003. Effects of particle size of alfalfa-based dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production. *Journal of Dairy Science* 86:630-643.

Belenguer A., Yañez D., Balcells J., Ozdemir Baber N.H., Gonzalez Ronquillo M. 2002. Urinary excretion of purine derivatives and prediction of rumen microbial outflow in goats. *Livestock Production Science* 77:127-135.

Becker S., Böger P., Oehlmann R., Ernst A. 2000. PCR Bias in Ecological Analysis: a Case Study for Quantitative *Taq* Nuclease Assays in Analyses of Microbial. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4945-4953.

Beever D.E., Harrison D.G., Thompson J.B, Cammell S.B., Osbourn D.F. 1974. A method for the estimation of dietary and microbial protein in duodenal digesta of ruminants. *British Journal of Nutrition* 32:99-112.

Begon M., Harper J. L., Townsend C. R. 1986. Ecology: individuals, populations, and communities. Sinauer Associates Inc., Boston. pp. 1698-1699.

Belanche A. 2008. Estudio del ecosistema ruminal y la producción de proteína microbiana mediante PCR a tiempo real. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

Belewu M.A., Ademilola A.A. 2002. Digestibility response of WAD goat to Mushroom (*Volvariella volvaceae*) treated cotton waste. *Moor Journal of Agricultural Research* 3:83-86.

Ben Omar N., Ampe F. 2000. Microbial community dynamics during production of the mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3664-3673.

Ben Salem H., Nefzaoui A., Ben Salem L., Tisserand J.L. 1999. Intake, digestibility, urinary excretion of purine derivatives and growth by sheep given fresh, air-dried or polyethylene glycol-treated foliage of *Acacia cyanophylla* Lindl. *Animal Feed Science and Technology* 78:297-311.

Ben Salem H., Ben Salem I., Nefzaoui A., Ben Said, M.S. 2003. Effect of PEG and olive cake feed blocks supply on feed intake, digestion, and health of goats given kermes oak (*Quercus coccifera* L.) foliage. *Animal Feed Science and Technology* 110:45-59.

Ben Salem H., Znaidi I.A. 2008. Partial replacement of concentrate with tomato pulp and olive cake-based feed blocks as supplements for lambs fed wheat straw. *Animal Feed Science and Technology* 147:206-222.

Berge Ph., Dulphy J.P. 1991. Etude des interactions entre fourrage et aliment concentré chez le mouton. II. Factors de variation de la digestibilité. *Annales de Zootechnie* 40:227-246.

Bessa R.J.B., Maia M.R.G., Jerónimo E., Belo A.T., Cabrita A.R.J. Dewhurst R.J., Fonseca A.J.M. 2009. Using microbial fatty acids to improve understanding of the contribution of solid associated bacteria to microbial mass in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 150:197-206.

Blackwood C.B., Marsh T., Kim S.H., Paul E.A. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 69:926-932.

Blackwood C.B., Hudleston D., Zak D.R., Buyer J.S. 2007. Interpreting ecological diversity indices applied to T-RFLP data: Insights from simulated microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 73:5276-5283.

Blanchart G., Durand M., Barry J.L., Bouiller-Oudot M., Jouany J.P. 1989. Intérêts et limites des fermenteurs à flux semicontinu de type Rusitec dans l'étude des fermentations du rumen. *Annales de Zootechnie* 38:285-314.

Blaxter K.L., Martín, A.K. 1962. The utilization of protein as a source of energy in fattening sheep. *British Journal of Nutrition* 16:397-407.

Bondi A.A. 1988. Nutrición Animal. Ed. Acribia. Zaragoza.

Brandt M.W., Rohr K., Lebzien P. 1980. Estimation of postruminally secreted protein-N in duodenal digesta of cows by means of 15 N. En: *Proceedings VI<sup>th</sup> International Symposium on Amino Acids*. Serock, Poland. Polish Scientific Publ. Varsovia, Polonia. 1-5.

Broderick G.A., Wallace R.G., Orskov E. 1991. Control of rate and extent of protein degradation. En: *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. (T. Tsuda, Y. Sasaki, R. Kawashima, eds). Academic Press, Orlando, FL, USA. 541-592.

Broderick G.A., Merchen N.R. 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *Journal of Dairy Science* 75:2618-2632.

Brooker J.D., O'Donovan L.A., Skene I., Clarke K., Blackall L., Muslera, P. 1994. *Streptococcus caprinus* sp. nov., a tannin-resistant ruminal bacterium from feral goats. *Letters in Applied Microbiology* 18:313-318.

Broudiscou L., Jouany, J.P. 1995. Reassessing the manipulation of protein synthesis by rumen microbes. *Reproduction Nutrition and Development* 35: 517-535.

Broudiscou L.P., Papon I., Broudiscou A.F. 2000. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology* 87:263-277.

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. *Journal of Dairy Science* 51:1950-1955.

Bueno M.S., Ferrari Jr.E. Bianchini D., Leinz F.F. Rodrigues, C.F.C. 2002. Effect of replacing corn with dehydrated citrus pulp in diets of growing kids. *Small Ruminant Research* 46:179-185.



Buchholz-Cleven B.E.E., Rattunde B., Straub, K.L. 1997. Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria using DGGE and whole-cell hybridization. *Systematic and Applied Microbiology* 20:301-309.

Busquet A., Calsamiglia S., Ferret A., Cardozo P.W., Kame C. 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *Journal of Dairy Science* 82:2508-2516.

Buttery P.J., Lewis D. 1982. Nitrogen metabolism in the rumen. En: *Forage protein in ruminant animal production*. (D.J. Thomson, D.E. Beever, and R.G. Gunn eds). Br. Soc. Anim. Prod. Occasional Publ. No. 6:1-11.

Calsamiglia S., Stern M.D., Firkins J.L. 1995. Effects of protein source on nitrogen metabolism in continuous culture and intestinal digestion *in vitro*. *Journal of Animal Science* 73:1819-1827.

Calsamiglia S., Stern M.D., Firkins J.L. 1996. Comparison of nitrogen-15 and purines as microbial markers in continuous culture. *Journal of Animal Science* 74:1375-1381.

Calsamiglia S., Ferret A., Devant M. 2002. Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *Journal of Dairy Science* 85:574-579.

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 diet pH. *Journal of Animal Science* 86:702-711.

Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C. 2004. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science* 82:3230-3236.

Carro M.D. 2001. La determinación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen: comparación entre marcadores microbianos (Revisión). *Investigación Agraria Producción y Sanidad Animales* 16:1-23.

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* semi-continuous culture system. *British Journal of Nutrition* 82:149-157.

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). *Animal Feed Science and Technology* 79:279-288.

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. *Animal Science* 70: 127-134.

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. *Animal Science* 75:315-321.

Carro M.D., Ranilla M.J., Martín-García 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.

Castillejos L., Calsamiglia S., Ferret A., Losa R. 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. *Animal Feed Science and Technology* 119:29-41

Castel J., Mena, Y., Delgado-Pertíñez M., Camúñez J., Basulto J., Caravaca F., Guzmán-Guerrero J.L., Alcalde. M.J. 2003. Characterization of semi-extensive goat production systems in southern Spain. *Small Ruminant Research* 47:133-143.

Cecava M.J., Merchen N.R., Gay L.C., Berger L.L. 1990. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. *Journal of Dairy Science* 73:2480-2488.

Cerrato-Sánchez M., Calsamiglia S., Ferret A. 2007a. Effects of patterns of suboptimal pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *Journal of Dairy Science* 90:4368-4377.

Cerrato-Sánchez M., Calsamiglia S., Ferret A. 2007b. Effects of time at suboptimal pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *Journal of Dairy Science* 90:1486-1492.

Cerrato-Sánchez M., Calsamiglia S., Ferret A. 2008. Effect of the magnitude of the decrease of rumen pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *Journal of Animal Science* 86:378-383.

Cerrillo M.A., Russell J.R., Crump M.H. 1999. The effects of hay maturity and forage to concentrate ratio on digestion kinetics in goats. *Small Ruminant Research* 32:51-60.

Chandramoni S., Jadhao B., Tiwari C.M., Khan M.Y. 2000. Energy metabolism with particular reference to methane production in Muzaffarnagari sheep fed rations varying in roughage to concentrate ratio. *Animal Feed Science and Technology* 83:287-300.

Chen X.B., Hovell F.D.D.B., Ørskov E.R., Brown D.S., 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. *British Journal of Nutrition* 63:131-142.

Chen X.B., Gomes M.J. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: An overview of

technical details. Int. Feed Res. Unit, Occasional Publ. Rowett Research Institute, Aberdeen, Reino Unido. pp. 1-21.

Chen X.B., Chen Y.K., Franklin M.F., Orskov E.R., Shand W.J. 1992. The effect of feed intake and body weight on purine derivative excretion and microbial protein supply in sheep. *Journal of Animal Science* 70:1534-1542.

Chen X.B., Samaraweera L., Kyle D.J., Ørskov E.R., Abeygunawardene H., 1996. Urinary excretion of purine content in microbial population derivatives and tissue xanthine oxidase activity in buffaloes, with special reference to differences between buffaloes and *Bos Taurus*. *British Journal of Nutrition* 75:397-407.

Chester-Jones H., Stern M.D., Su A., Donker J.D., Ziegler D.M., Miller P. 1990. Evaluation of various nitrogen supplements in starter diets for growing Holstein steers and their effects on ruminal bacterial fermentation in continuous culture. *Journal of Animal Science* 68:2954-2064.

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. *Journal of Animal Science* 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. *Journal of Dairy Science* 75:2304-2323.

Clement B.G., Kehl L.E., Debord K.L., Kitts C.L. 1998. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR based method for the comparison of complex bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods* 31:135-142.

Cole J.R., Chai B., Marsh T.L., Farris R.J., Wang Q., Kulam S.A., Chandra S., McGarrell D.M., Schmidt T.M., Garrity G.M., Tiedje J.M. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research* 31:442-443.

Coleman G.S. 1979. The role of rumen protozoa in the metabolism of ruminants given tropical feeds. *Tropical Animal Production* 4:199-213.

Colombatto D., Morgavi D.P., Furtado A.F., Beauchemin K.A. 2003 Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: Relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. *Journal of Animal Science* 81: 2628-2638.

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. *Animal Feed Science and Technology* 137:150-162.

Cotta M.A., Russell J.B. 1982. Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture. *Journal of Dairy Research* 65:226-234.

Craig W.M., Broderick G.A., Ricker D.B. 1987. Quantitation of Microorganisms Associated with the Particulate Phase of Ruminant Ingesta. *Journal of Nutrition* 117:57-62.

Crawford R.J., Hoover W.H., Junkins L.L. 1980. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. I. Dry matter and fiber digestion, VFA production and protozoa numbers. *Journal of Animal Science* 51:975-985.

Crawford R.J., Shriver B.J., Varga G.A., Hoover W.H. 1983. Buffer Requirements for Maintenance of pH during Fermentation of Individual Feeds in Continuous Cultures. *Journal of Dairy Science* 66:1881-1890.

Cruz Soto R., Muhammed S.A., Newbold C.J., Stewart C.S., Wallace R.J. 1994. Influence of peptides, amino acids and urea on microbial activity in the rumen of sheep receiving grass hay on the growth of rumen bacteria *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology* 49:151-161.

Czerkawski J.W., Breckenridge G. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition* 38: 371-384.

Czerkawski J.W. 1986. Degradation of solid feeds in the rumen: spatial distribution of microbial activity and its consequences. En: *Proceedings of 6th International Symposium on Ruminant Physiology*. Englewood Cliffs, N.J. USA. pp. 158-172.

Currier T.A., Bohnert D.W., Falck S.J., Schauer C.S., Bartle S.J. 2004. Daily and alternate-day supplementation of urea or biuret to ruminants consuming low-quality forage: II. Effects on site of digestion and microbial efficiency in steers. *Journal of Animal Science* 82:1518-1527.

Dahlberg E.M., Stern M.D., Ehle F.R. 1988. Effects of forage source on ruminal microbial nitrogen metabolism and carbohydrate digestion in continuous culture *Journal of Animal Science* 66:2071-2083.

Das A., Ghosh S.K. 2007. Effect of partial replacement of concentrates with jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) leaves on growth performance of kids grazing on native pasture of Tripura, India. *Small Ruminant Research* 67:36-44.

Davey L.A., Cheeseman G.C. Briggs C.A.E. 1960. Evaluation of an improved artificial rumen designed for continuous control during prolonged operation. *Journal of Agricultural Science* 55:155.

Dawson K.A., Newman K.E., Boling J.A. 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. *Journal of Animal Science* 68:3392-3398.

- Dehority B.A. 1984. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Applied and Environmental Microbiology* 48:182-185.
- Dehority B.E., Tirabasso P.A., Grifo Jr.A.P. 1989. Most-probable-number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. *Applied and Environmental Microbiology* 55:2789-2792.
- Dehority B.A. 1995. Methodology for measuring microbial growth in the rumen. En: *Proceedings of the International Symposium on the Nutrition Requirements of Ruminants*. Universidad Federal de Vicosa, Vicosa-MG-Brasil. 121-137.
- DeLong E.F., Wickham G.S., Pace N.R. 1989. Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243:1360-1363.
- Demeyer, D.I. 1981. Rumen microbes and digestion of plant cell walls. *Agricultural Environment* 6:295-337.
- Devant M., Ferret A., Gasa J., Calsamiglia S., Casals R. 2000. Effects of protein concentration and degradability on performance, ruminal fermentation, and nitrogen metabolism in rapidly growing heifers fed high-concentrate diets from 100 to 230 kg body weight. *Journal of Animal Science* 78:1667-1676.
- 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*. *Journal of Animal Science* 79:1944-1953.
- Devendra C. 1980. Potential of sheep and goats in less developed countries. *Journal of Animal Science* 51:461-473.
- Devendra C., Burns M. 1983. Goat production in the tropics. Commonwealth Agric. Bureaux Publ., Farnham Royal, Slough, Reino Unido. pg. 183.
- Dewhurst R.J., Davies D.R., Merry R.J. 2000. Microbial protein supply from the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 85:1-21.
- de Rancourt M., Fois N., Lavín M.P., Tchakérian E., Vallerand F. 2006. Mediterranean sheep and goats production: An uncertain future. *Small Ruminant Research* 62:167-179.
- de Veth M.J., Kolver E.S. 2001. Digestion of ryegrass pasture in response to change in pH in continuous culture. *Journal of Dairy Science* 84:1449-1457.
- Dijkstra J. 1994. Production and absorption of volatile fatty acids in the rumen. *Livestock Production Science* 39:61-69.

Dijkstra J., France J. Davies D.R. 1998. Different mathematical approaches to estimating microbial protein supply in ruminants. *Journal of Dairy Science* 81: 3370-3384.

Dixon R.M., Stockdale C.R. 1999. Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilisation. *Australian Journal of Agricultural Research* 50:757-774.

Domingue B.M.F., Dellow D.W., Barry T.N. 1991. Voluntary intake and rumen digestion of a low-quality roughage by goats and sheep. *Journal of Agricultural Science* 117:111-120.

Dove H. 2002. Principles of supplementary feeding in sheep grazing systems. En: *Sheep nutrition*. (M Freer, H. Dove H. eds). Collingwood, Vic., Australia: CSIRO Publishing. 119-142.

Dulphy J.P., Kouassi A., Bienaime A. 1982. Étude de la valeur alimentaire des pailles de céréales traitées ou non à la soude. II. Influence de la nature du complément énergétique. *Annales de Zootechnie* 31:215-232.

Dulphy J.P., Breton J., Louyot J.M., Bienaime A. 1983. Étude de la valeur alimentaire des pailles de céréales traitées ou non à la soude. III. Influence du niveau d'apport d'aliment concentré. *Annales de Zootechnie* 32:53-80.

Dunbar J., Ticknor L.O., Kuske C.R. 2000. Assessment of microbial diversity in four Southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 66:2943-2950.

Dunbar J., Ticknor L.O., Kuske C.R. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 67:190-197.

Dung N.T., Mui N.T., Ledin I. 2005. Effect of replacing a commercial concentrate with cassava hay (*Manihot esculenta* Crantz) on the performance of growing goats. *Animal Feed Science and Technology* 119:271-281.

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. *Animal Feed Science and Technology* 21:197-204.

Edionwe A.O., Owen F.G. 1989. Relation of intake to digestibility of diets containing soyhulls and distillers dried grains. *Journal of Dairy Science* 72: 1786-1792.

Edwards J.E., McEwan N.R., McKain N., Walker N., Wallace R.J. 2005. Influence of flavomycin on ruminal fermentation and microbial populations in sheep. *Microbiology* 151:717-725.

Edwards J.E., Huws S.H., Kim E.J., Kingston-Smith A.H. 2007. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in bovine rumen. *FEMS Microbiology Ecology* 62:323-335.

El Aich A., Landau S., Napoleone M., Borbouze A., 1995. Goat production systems in the Mediterranean: a comparative study. En: *Goat Production Systems in the Mediterranean*. (A. El Aich, S. Landau, A. Borbouze, R. Rubino, P. Morand-Fehr eds). EAAP Publication, Wageningen Pers, Wageningen. 71: 222-237.

Elliott R.C., Topps J.H. 1963. Nitrogen metabolism of African cattle fed diets with an adequate energy, low protein content. *Nature* 197:668-670.

Ellis W.C., Pfander W.H. 1965. Rumen microbial polynucleotide synthesis and its possible role in ruminant nitrogen utilization. *Nature* 205:974-975.

El-Meccawi S., Kam M., Brosh A., Degen A.A. 2009. Energy intake, heat production and energy and nitrogen balances of sheep and goats fed wheat straw as a sole diet. *Livestock Science* doi:10.1016/j.livsci.2009.02.018.

Emery R.S., Brown L.D. 1961. Effect of feeding sodium and potassium bicarbonate on milk fat, rumen pH, and volatile fatty acid production. *Journal of Dairy Science* 44:1899-1902.

Engebretson J.J., Moyer C.L. 2003. Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4823-4829.

Erfle J.D., Sauer F.D., Mahadevan S. 1977. Effect of ammonia concentration on activity of enzymes of ammonia assimilation and on synthesis of amino acids by mixed rumen bacteria in continuous culture. *Journal of Dairy Science* 60:1064-1072.

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*. *Journal of Dairy Science* 65:1457-1464.

Faichney G. J. 1993. Digesta flow. En: *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. (J.M. Forbes, J. France eds). CAB Int., Wallingford, Reino Unido. 53-85.

FAO, 1999. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agricultural Statistics, Roma, Italia.

FAO, 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia. *Food outlook*, no. 2. Diciembre, 2006.  
<http://www.fao.org/newsroom/en/news/2006/1000459/index.html>

FAO, 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia. Crop Prospect and Food Situation, No. 1. Febrero 2009. <http://www.fao.org/docrep/011/ai480e/ai480e00.htm>

FAOSTAT. 2005. Bases de datos estadísticos de la FAO. <http://faostat.fao.org>

Faverdin P., Dulphy J.P., Coulon J.B., Vérité R., Garel J.P., Rouel J., Marquis B. 1991. Substitution of roughage by concentrates for dairy cows. *Livestock Production Science* 27:137-156.

Fellner V., Sauer F.D., Kramer J.K.G. 1995. Steady-state rates of linoleic acid biohydrogenation by ruminal bacteria in continuous culture. *Journal of Dairy Science* 78:1815-1823.

Firkins J.L. 1996. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. *The Journal of Nutrition* 126:1347-1354S.

Firkins J.L., Allen M.S., Oldick B.S., St-Pierre N.R. 1998. Modeling ruminal digestibility of carbohydrates and microbial protein flow to the duodenum. *Journal of Dairy Science* 81:3350-3369.

Firkins J.L., Hristov A.N., Hall M.B., Varga G.A., St-Pierre, N.R. 2006. Integration of ruminal metabolism in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 89: E31-E51.

Firkins J.L., Z. Yu Z. 2006. Characterisation and quantification of the microbial populations of the rumen. En: *Ruminant Physiology, Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress*. (K. Sejrsen, T. Hvelplund, M.O. Nielsen, eds). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Holanda. 19-54.

Focant M., Vanbelle M., Godfroid S. 1986. Feeding behaviour and rumen motility in goats and sheep fed two hay-barley diets. *Reproduction Nutrition Development* 26:277-278.

Franklin R.B., Mills A.L. 2003. Multi-scale variation in spatial heterogeneity for microbial community structure in an eastern Virginia agricultural field. *FEMS Microbiology Ecology* 44:335-346.

Freeman W.M., Walker S.J., Vrana K.E. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 26:112-122.

Frostegard A., Courtois S., Ramisse V., Clerc S., Bernillon D., Le Gall F., Jeannin P., Nesme X., Simonet P. 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65:5409-5420.

Fu C.J., Felton E.E., Lehmkuhler J.W., Kerley M.S. 2001. Ruminal peptide concentration required to optimize microbial growth and efficiency. *Journal of Animal Science* 79:305-312.



Fuchigami M., Senshu T., Horiguchi M. 1989. A simple continuous culture system for rumen microbial digestion study and effects of defaunation and dilution rates. *Journal of Dairy Science* 72:3070-3078.

Fujihara T., Shem M.N., Nakamura K. 2005. Effect of dietary energy levels on the urinary excretion of purine derivatives in sheep. *Animal Science Journal* 76: 441-445.

Fujita T., Kajita M., Sano H. 2006. Responses of whole body protein synthesis, nitrogen retention and glucose kinetics to supplemental starch in goats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 144:180-187.

Galyean M.L., Goetsch A.L. 1993. Utilization of forage fiber by ruminants. En: *Cell wall structure and digestibility*. (H. G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield, J. Ralph eds). ASA-CSSA-SSSA, Madison, WJ. pp. 33-71.

García A., Doménech V., Frías J.J., Herrera M., Peña F., Martos J., Acero R. 1999. Caracterización técnico-económica de los sistemas de producción de caprino extensivo en Jaén como base del desarrollo sostenible. En: *Analistas Económicos de Andalucía*, Málaga. pg. 124.

García Trujillo, R. 2004. El uso de la Emergía en la evaluación de la sustentabilidad de sistemas ganaderos. En: *VI Congreso de la SEAE, Almería*.

Gevers D., Cohan F.M., Lawrence J.G., Spratt B.G., Coenye T., Feil E.J., Stackebrandt E., Van de Peer Y., Vandamme P., Thompson F.L. 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* 3:733-739.

Giger S. 1987. Influence de la composition de l'aliment concentré sur la valeur alimentaire des rations destinées au ruminant laitier. Tesis Doctoral. Institut Nationale Agronomique, Paris-Grignon.

Giger-Reverdin S., Aufrère J., Sauvant D., Demarquilly C. Vermorel M. 1994. Prediction of the energy values of compound feeds for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 48:73-98.

Giovannoni S.J., DeLong E.F., Olsen G.J., Pace N.R. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology* 170:720-726.

Giraldo L.A., Tejido M.L., Ranilla M.J., Ramos S., Carro M.D. 2008. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. *Journal of Animal Science* 86:1617-1623.

Gizzi G., Zanchi R., Sciaraffia F. 1998. Comparison of microbiological and fermentation parameters obtained with an improved rumen *in vitro* technique with those obtained *in vivo*. *Animal Feed Science and Technology* 73:291-305.

Goetsch A.L., Detweiler G., Sahlu T., Puchala R., Dawson L.J. 2001. Dairy goat performance with different dietary concentrate levels in late lactation. *Small Ruminant Research* 41:117-125.

Gong J., Forster R.J., Yu H., Chambers J.R., Sabour P.M., Wheatcroft R., Chen S. 2002. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS microbiology letters* 208:1-7.

Gonzalez-Ronquillo M., Balcells J., Guada J.A., Vicente F. 2003. Purine derivative excretion in dairy cows: Endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. *Journal of Dairy Science* 86:1282-1291.

González-Ronquillo M., Balcells J., Belenguer A., Castrillo C., Mota M. 2004. A comparison of purine derivatives excretion with conventional methods as indices of microbial yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87:2211-2221.

Griswold K.E., Hoover W.H., Miller T.K., Thayne W.V. 1996. Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture. *Journal of Animal Science* 74:483-491.

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. *Journal of Animal Science* 81:329-336.

Guérin H., Dulphy J.P. 1984. Influence de l'apport complémentaire de maïs, de pulpe de bet-terave ou de mélasse sur la valeur alimentaire d'un foin. *Annales de Zootechnie* 33:509-532.

Hadjigeorgiou I.E., Gordon I.J., Milne J.A. 2001. The intake and digestion of a range of temperate forages by sheep and fibre-producing goats. *Small Ruminant Research* 39:167-179.

Hadjigeorgiou I.E., Gordon I.J., Milne J.A. 2003. Intake, digestion and selection of roughage with different staple lengths by sheep and goats. *Small Ruminant Research* 47:117-132.

Hadjipanayiotou M., Antoniou T. 1983. A comparison of rumen fermentation patterns in sheep and goats given a variety of diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34:1319-1322.

Hadjipanayiotou M. 1987. Studies on the response of lactating Damascus goats to dietary protein. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 57:41-52.

Haenlein G.F.W. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research* 51:155-163.

Han H., Hussein H.S., Glimp H.A., Saylor D.H., Greene L.W. 2002. Carbohydrate fermentation and nitrogen metabolism of a finishing beef diet by ruminal microbes in continuous cultures as affected by ethoxyquin and (or) supplementation of monensin and tylosin. *Journal of Animal Science* 80:1117-1123.

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 soya bean products. *Animal Feed Science and Technology*, 16:51-62.

Herrera-Saldana R.E., Huber, J.T., Poore M.H. 1990. Dry matter, crude protein, and starch degradability of five cereal grains. *Journal of Dairy Science* 73: 2386-2393.

Hespell R.B., Aiken D.E., Dehority B.A. 1997. Bacteria, protozoa and fungi of the rumen. En: *Gastrointestinal Microbiology* (R. Mackie, B.A. White, R.E. Isaacson eds). Chapman and Hall, Nueva York. Vol. 2, pp. 59-141.

Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K., Wellington E.M. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* 63:3233-3241.

Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nature Biotechnology* 11: 1026-1030.

Hill G.T., Mitkowski N.A., Aldrich-Wolfe L., Emele L.R., Jurkonie D.D., Ficke A., Maldonado-Ramirez S., Lynch S.T., Nelson E.B. 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 15:25-36.

Hobson P.N. 1965. Continuous culture of some anerobic and facultatively anaerobic rumen bacteria. *Journal of General Microbiology* 38:167-180.

Hobson, P.N., Stewart, C.S. 1997. *The rumen microbial ecosystem*. Springer. Blackie, Londres.

Hongoh Y., Deevong P., Inoue T., Moriya S., Trakulnaleamsai S., Ohkuma M., Vongkaluang C., Noparatnaraporn N., Kudo T. 2005. Intra- and interspecific comparisons of bacterial diversity and community structure support coevolution of gut microbiota and termite host. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 6590-6599.

Hoover W.H., Crooker B.A., Sniffen C.J. 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *Journal of Animal Science* 43:528-534.

Hoover W.H., Kincaid C.R., Varga G.A., Thayne W.V., Junkins Jr L.L. 1984. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. IV. pH and dilution rate. *Journal of Animal Science* 58:692-699.

Hoover W.H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *Journal of Dairy Science* 69:2755-2766.

Hoover W.H., Miller T.K., Stokes S.R., Thayne W.V. 1989. Effects of fish meals on rumen bacterial fermentation in continuous culture. *Journal of Dairy Science* 72:2991-2998.

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. *Animal Feed Science and Technology* 128:307-319.

Howe J.C., Barry T.N., Popay A.I. 1988. Voluntary intake and digestion of gorse (*Ulex europaeus*) by goats and sheep. *Journal of Agricultural Science* 11:107-114.

Hristov A.N., Broderick G.A. 1996. Synthesis of microbial protein in ruminally cannulated cows fed alfalfa silage, alfalfa hay, or corn silage. *Journal of Dairy Science* 79:1627-1637.

Hristov A.N., McAllister T.A., Ouellet D.R., Broderick G.A. 2005. Comparison of purines and nitrogen-15 as microbial flow markers in beef heifers fed barley-or corn-based diets. *Canadian Journal of Animal Science* 85:211-222.

Hungate R.E. 1966. *The rumen and its microbes*. Academic Press, Nueva York. 65-26041. 533 pgs.

Hutton K., Bailey F.J., Annison E.F. 1971. Measurement of the bacterial nitrogen entering the duodenum of the ruminant using diaminopimelic acid as a marker. *British Journal of Nutrition* 25:165-173.

Hvelplund T. 1986. The influence of diet on nitrogen and amino acid content of mixed rumen bacteria. *Acta Agriculturae Scandinavica* 36:325-331.

Hvelplund T., Madsen J. 1985. Amino acid passage to the small intestine in dairy cows compared with estimates of microbial protein and undegraded dietary protein from analysis on the feed. *Acta Agriculturae Scandinavica* 25: 21-32.

INRA, 1978. *Alimentation des ruminants*. (R. Jarrige ed). Institute National de la Recherche Agronomique. Versailles, Francia.

INRA, 1988. *Alimentation des bovins, ovins et caprins*. (R. Jarrige ed). Institute National de la Recherche Agronomique. Paris, Francia.

Islam M., Abe H., Hayashi Y., Terada F. 2000. Effects of feeding Italian ryegrass with corn on rumen environment, nutrient digestibility, methane emission, and energy and nitrogen utilization at two intake levels by goats. *Small Ruminant Research* 38:165-174.

Jackson C.R., Langner H.W., Donahoe-Christiansen J., Inskeep W.P., McDermott T.R. 2001. Molecular analysis of microbial community structure in an arsenite-oxidizing acidic thermal spring. *Environmental Microbiology* 3:532-542.

Jetana T., Abdullah N., Halim R.A., Jalaludin S., Ho Y.W. 2000. Effects of energy and protein supplementation on microbial-N synthesis and allantoin excretion in sheep fed guinea grass. *Animal Feed Science and Technology* 84: 167-182.

Johnson R.R. 1966. Studies techniques and procedures for *in vitro* and *in vivo* rumen. *Journal of Animal Science* 25:855-875.

Jouany J.P., Senaud J., Lefaivre J., Vizet A. 1979. Defaunation du rumen de mouton. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 19:619-624.

Jouany J.P., Demeyer D.I., Grain J. 1988. Effect of defaunating the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 21:229-265.

Junier P., Junier T., Witzel K.P. 2008. TRiFLe: a program for in silico T-RFLP analysis with user-defined sequences sets. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:10.1128/AEM.01394-08

Kajikawa H., Jin H., Terada F., Suga T. 2003. Operation and characteristics of newly improved and marketable artificial rumen (Rusitec). *Memoirs of National Institute of Livestock and Grassland Science* 2:1-49.

Kang-Meznarich J.H., Broderick G.A. 1980. Effects of incremental urea supplementation on ruminal ammonia concentration and bacterial protein formation. *Journal of animal science* 51:422-431.

Kanjanapruthipong J., Leng R.A. 1998. Purine derivatives excreted in urine as an indicator estimating microbial yield from the rumen: A review. *Australian Journal of Agricultural Research* 11:209-216.

Kaplan C.W., Astaire J.C., Sanders M.E., Reddy B.S., Kitts C.L. 2001. 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment pattern analysis of bacterial communities in feces of rats fed *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology* 67:1935-1939.

Kaplan C.W., Kitts C.L. 2004. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Applied and Environmental Microbiology* 70:1777-1786.

Karunanandaa K., Varga G.A. 1996. Colonization of rice straw by white-rot fungi(*Cyathus stercoreus*): Effect on ruminal fermentation pattern, nitrogen

metabolism, and fiber utilization during continuous culture. *Animal Feed Science and Technology* 61:1-16.

Kaur R., Nandra K.S., Garcia S.C., Fulkerson W.J., Horadagoda A. 2008. Efficiency of utilisation of different diets with contrasting forages and concentrate when fed to sheep in a discontinuous feeding pattern. *Livestock Science* 119: 77-86.

Kawas J.R., Lopes J., Danelon D.L., Lu C.D. 1991. Influence of forage-to-concentrate ratios on intake, digestibility, chewing and milk production of dairy goats. *Small Ruminant Research* 4:11-18.

Keady T.W.J., Mayne C.S. 2001. The effects of concentrate energy source on feed intake and rumen fermentation parameters of dairy cows offered a range of grass silages. *Animal Feed Science and Technology* 90:117-129.

Kent A.D., Smith D.J., Benson B.J., Triplett E.W. 2003. Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 69:6768-6776.

Khalili H., Sairanen A. 2000. Effect of concentrate type on rumen fermentation and milk production of cows at pasture. *Animal Feed Science and Technology* 84:199-212.

Kitts C.L. 2001. Terminal Restriction Fragment Patterns: A tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 2:17-25.

Kim E.J., Huws S.A., Lee M.R.F., Wood J.D., Muetzel S.M., Wallace R.J., Scollan N.D. 2008. Fish oil increases the duodenal flow of long chain polyunsaturated fatty acids and trans-11 18: 1 and decreases 18: 0 in steers via changes in the rumen bacterial community. *Journal of Nutrition* 138:889-896.

Klieve A.V., Hennessy D., Ouwerkerk D., Forster R.J., Mackie R.I., Attwood G.T. 2003. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. *Journal of Applied Microbiology* 95:621-630.

Koch M., Strobel E., Tebbe C.C., Heritage J., Breves G., Huber K. 2007. Transgenic maize in the presence of ampicillin modifies the metabolic profile and microbial population structure of bovine rumen fluid *in vitro*. *British Journal of Nutrition* 96:820-829.

Koike S., Yoshitani S., Kobayashi Y., Tanaka K. 2003. Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 229:23-30.

Krause D.O., Russell, J.B. 1996. How many ruminal bacteria are there? *Journal of Dairy Science* 79:1467-1475.

Krause K.M., Combs D.K., Beauchemin K.A. 2002. Effects of forage particle size and grain fermentability in midlactation cows. II. Ruminant pH and chewing activity. *Journal of Dairy Science* 85:1947-1957.

Kung L.J., Tung R.S., Carmean B.R. 1992. Rumen fermentation and nutrient digestion in cattle fed diets varying in forage and energy source. *Animal Feed Science and Technology* 39:1-12.

Kung L., Kreck E.M., Tung R.S., Hession A.O., Sheperd A.C., Cohen M.A., Swain H.E., Leedle J.A.Z. 1997. Effects of a live yeast culture and enzymes on *in vitro* ruminal fermentation and milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 80:2045-2051.

Larson E.M., Stock R.A., Klopfenstein T.J., Sindt M.H., Huffman R.P. 1993. Feeding value of wet distillers byproducts for finishing ruminants. *Journal of Animal Science* 71:2228-2236

Lascano G.J., Heinrichs A.J. 2009. Rumen fermentation pattern of dairy heifers fed restricted amounts of low, medium, and high concentrate diets without and with yeast culture. *Livestock Science*. doi:10.1016/j.livsci.2008.12.007.

Lefrileux Y., Morand-Fehr P., Pommare A. 2008. Capacity of high milk yielding goats for utilizing cultivated pasture. *Small Ruminant Research* 77:113-126.

Legendre P., Gallagher E.D. 2001. Ecologically meaningful transformation for ordination of species data. *Oecologia* 129:271-280.

Leng R.A., Nolan J.V. 1984. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* 67:1072-1089.

Li F., Hullar M.A.J., Lampe J.W. 2007. Optimization of terminal restriction fragment polymorphism (TRFLP) analysis of human gut microbiota. *Journal of Microbiological Methods* 68:303-311.

Li D., Hou X., Liu Y. 2008. Effect of diet composition on digestion and rumen fermentation parameters in sheep and cashmere goats. *Animal Feed Science and Technology* 146:337-344.

Liang J.B., Pimpa O., Abdullah N., Jalan Z.A., Nolan J.V., 1999. Estimation of rumen microbial protein production from urinary purine derivatives in zebu cattle and water buffalo. En: *Nuclear based technologies for estimating microbial protein supply in ruminant livestock*. IAEA-TECDOC-1093, Viena. pp. 35-42.

Lindberg J.E., Gonda H.L. 1997. Fibre and protein digestion in goats. *Recent Advances in Goat Research. Cahiers Options Méditerranéennes* 25:47-58.

Lipoglavšek L., Avguštin G. 2004. Obstacles to flow cytometric analysis of rumen microbial samples. *Folia Microbiologica* 49:183-186.

- Littell R. C., Henry P. R., Ammerman C. B. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Science* 76:1216-1231.
- Liu W.T., Marsh T.L., Cheng, H., Forney L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4516-4522.
- Liu X., Wang Z., Lee F. 2005. Influence of concentrate level on dry matter intake, N balance, nutrient digestibility, ruminal outflow rate, and nutrient degradability in sheep. *Small Ruminant Research* 58:55-62.
- Loor J.J., Hoover W.H., Miller-Webster T.K., Herbein J.H., Polan C.E. 2003. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids in continuous culture fermenters during digestion of orchardgrass or red clover with three levels of ground corn supplementation. *Journal of Animal Science* 81:1611-1627.
- Lourenco 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. *Journal of Animal Science* 86:3045-3053.
- Lu C.D. 1989. Grazing behavior and diet selection of goats. *Small ruminant research* 1:205-216
- Mackie R.I., Aminov R.I., Hu W., Klieve A.V., Ouwerkerk D., Sundset, M.A., Kamagata, Y. 2003. Ecology of uncultivated *Oscillospira* species in the rumen of cattle, sheep, and reindeer as assessed by microscopy and molecular approaches. *Applied and Environmental Microbiology* 69:6808-6815.
- Madrid J., Hernández F., Pulgar M.A., Cid J.M. 1997. Urea and citrus by-product supplementation of straw-based diets for goats: effect on barley straw digestibility. *Small Ruminant Research* 24 :149-155.
- Maeda H., Fujimoto C., Haruki I., Maeda T., Kokeguchi S., Petelin M., Arai H., Tanimoto I., Nishimura F., Takashiba S. 2003. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 39:81-86.
- Maeng W.J., Baldwin R.L. 1976. Factors influencing rumen microbial growth rates and yields: effect of amino acid additions to a purified diet with nitrogen from urea. *Journal of Dairy Science* 59:648-655.
- Mahgoub O., Kadim I.T., Forsberg N.E., Al-Ajmi D.S., Al-Saqry N.M., Al-Abri A.S., Annamalai K. 2005. Evaluation of Meskit (*Prosopis juliflora*) pods as a feed for goats. *Animal Feed Science and Technology* 121:319-327.



Makkar H.P.S., Becker K. 2007. Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. *British Journal of Nutrition* 81:107-112.

Malau-Aduli B.S., Eduvie L.O., Lakpini C.A.M., Malau-Aduli A.E.O. 2003. Variations in liveweight gains, milk yield and composition of Red Sokoto goats fed crop-residue-based supplements in the subhumid zone of Nigeria. *Livestock Production Science* 83:63-71.

Mansfield H.R., Stern M.D., Otterby D.E. 1994. Effects of beet pulp and animal by-products on milk yield and *in vitro* fermentation by rumen microorganisms. *Journal of Dairy Science* 77:205-216.

Mansfield H.R., Endres M.I., Stern D. 1995. Comparison of microbial fermentation in the rumen of dairy cows and dual flow continuous culture. *Animal Feed Science and Technology* 55:47-66.

Manz W., Amann R., Szewzyk R., Szewzyk U., Stenstrom T.A., Hutzler P., Schleifer K.H. 1995. In situ identification of Legionellaceae using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology* 141:29-39.

MARM. 2007. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. <http://aplicaciones.mapa.es/documentos-cuotas/33CENSOSOVCAP2007.pdf>

Marrugan A. 1988. *Ecology diversity and its measurement*. Chapman and Hall. Londres, Reino Unido.

Marsh T.L. 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology* 2:323-327.

Marsh T.L., Saxman P., Cole J., Tiedje J. 2000. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3616-3620.

Martín C., Williams A.G., Michalet-Doreau B. 1994. Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents. *Journal of Animal Science* 72:2962-2968.

Martín-García A.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. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.

Martín-García A.I., Moumen A., Yáñez-Ruiz D., Molina-Alcaide E. 2003. Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology* 107: 61-74.

Martín-García A.I., Yáñez-Ruiz D.R., Moumen A., Molina-Alcaide E. 2004. Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal supply on two-stage olive cake fermentation. *Animal Research* 53:245-257.

Martín-García, A.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 Ruminant Research* 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. *Animal Feed Science and Technology* 71:269-282.

Martín-Orúe, S.M., Balcells, J., Vicente, F., Castrillo, C. 2000. Influence of dietary rumen-degradable protein supply on rumen characteristics and carbohydrate fermentation in beef cattle offered high-grain diets. *Animal Feed Science and Technology* 88:59-78.

Marston H.R. 1948. The fermentation of cellulose *in vitro* by organisms from the rumen of sheep. *Biochemistry International* 42:564-574.

Massol-Deya A.A., Odelson D.A., Hickey R.F. Tiedje J.M. 1995. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). En: *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Holanda. pp. 1-8.

McAllan A.B., Smith R.H. 1973. Degradation of nucleic acid derivatives by rumen bacteria *in vitro*. *British Journal of Nutrition* 29:467-474.

McAllan A.B. 1982. The fate of nucleic acids in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society* 41:309-316.

McAllan A.B., Sutton J.D., Beever D.E., Napper D.J. 1994. Rumen fermentation characteristics and duodenal nutrient flow in lactating cows receiving two types of grass silage with two levels of concentrates. *Animal Feed Science and Technology* 46:277-291.

McDougall E.I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal* 43:99-109.

McSweeney C.S., Denman S.E. 2007. Effect of sulphur supplements on cellulolytic rumen micro-organisms and microbial protein synthesis in cattle fed a high fibre diet. *Journal of Applied Microbiology* 103:1757-1765.

Mena Guerrero Y., Castel Genís J.M., Caravaca Rodríguez F.P., Guzmán Guerrero J.L., González Redondo P. 2005. Situación actual, evolución y diagnóstico de los sistemas semiextensivos de producción caprina en Andalucía centro-occidental. *Junta de Andalucía*. Sevilla, España. ISBN: 84-8474-160-5.

Mena Y., Castel J.M., Romero F., García M., Micheo J.M. 2005. Caracterización técnico-económica de los sistemas caprinos lecheros de raza Malagueña. En: *XXX Jornadas científicas y IX Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, Granada, España. 175-177.

Meng, Q., Kerley, M.S., Ludden, P.A., Belyea, R.L. 1999. Fermentation substrate and dilution rate interact to affect microbial growth and efficiency. *Journal of Animal Science* 77:206-214.

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. *British Journal of Nutrition* 50:701-709.

Merry R.J., Smith R.H., McAllan A.B. 1987. Studies of rumen function in an *in vitro* continuous culture system. *Archiv für Tierernährung* 37:475-488.

Miettinen H., Setälä J. 1989. Design and development of a continuous culture system to study rumen fermentation. *Journal of Agricultural Science in Finland* 61:463-473.

Mølbak L., Johnsen K., Boye M., Jensen T.K., Johansen M., Møller K., Leser T.D. 2008. The microbiota of pigs influenced by diet texture and severity of *Lawsonia intracellularis* infection. *Veterinary Microbiology* 128:96-107.

Molina Alcaide E., Garcia M.A., Aguilera J.F. 1997. The voluntary intake and rumen digestion by grazing goats and sheep of a low-quality pasture from a semi-arid land. *Livestock Production Science* 52:39-47.

Molina Alcaide E., García A.I.M., 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. *Livestock Production Science* 64:215-223.

Molina-Alcaide E., Yáñez-Ruiz D.R. 2008. Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. *Animal Feed Science and Technology* 147:247-264.

Molina-Alcaide E., Moumen A., Martín-García A.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. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* doi:10.1111/j.1439-0396.2008.00834.x

Moorby J.M., Dewhurst R.J., Evans R.T., Danelon J.L. 2006. Effects of dairy cow diet forage proportion on duodenal nutrient supply and urinary purine derivative excretion. *Journal of Dairy Science* 89:3552-3562.

Morales A.R., Galina M.A., Jimenez S., Haenlein G.F.W. 2000. Improvement of biosustainability of a goat feeding system with key supplementation. *Small Ruminant Research* 35:97-105.

Morand-Fehr P., Sauvant D. 1978. Nutrition and optimum performance of dairy goats. *Livestock Production Science* 5:203-213.

Morand-Fehr P. 1989. Goat nutrition and its particularities in the dry subtropics. En: *Ruminant Production in the Dry Subtropics: Constraints and Potentials*. EAAP Publication nº 38. Holanda. pp. 215-229.

Morand-Fehr P., Owen E., Giger-Reverdin S. 1991. Feeding behaviour of goats at the trough. En: *Goat Nutrition*. (P. Morand-Fehr ed). EAAP Publication nº 46. Holanda. pp. 3-12.

Moss A.R., Givens D.I. 2002. The effect of supplementing grass silage with soya bean meal on digestibility, in sacco degradability, rumen fermentation and methane production in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 97:127-144.

Mota M., Balcells J., Ozdemir Babar N.H., Bölüktepe S., Belenguer A. 2008. Modelling purine derivative excretion in dairy goats: endogenous excretion and the relationship between duodenal input and urinary output. *Animal* 2:44-51.

Mould F.L., Ørskov E.R. 1983. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Animal Feed Science and Technology* 10:1-14.

Mould F.L., Ørskov E.R., Mann S.O. 1983. Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. *Animal Feed Science and Technology* 10:15-30.

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. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.

Moumen A., Yanez-Ruiz D.R., Martin-Garcia I., Molina-Alcaide E. 2008. Fermentation characteristics and microbial growth promoted by diets including two-phase olive cake in continuous fermenters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92:9-17.

Muetzel S., Lawrence P., Hoffmann E.M., Becker K. 2009. Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. *Animal Feed Science and Technology* 151:32-43.

Mullis K.B. 1989. The polymerase chain reaction: why it works. En: *Current communications in molecular biology: Polymerase chain reaction* (H.A Erlich, R. Gibbs, H.H. Kazazian, Jr. eds). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. pp. 237- 243.

Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden G.A. 1993. Profiling of complex populations by denaturing gradient gel electrophoresis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59:695-700.

Muyzer G., Ramsing, N.B. 1995. Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Water Science and Technology* 32:1-9.

Muyzer G., Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:127-141.

National Research Council. NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7.rev. ed. Washington, D.C.

Narjisse H., Malechek J.C. 1990. Behavioral ecology of sheep and goats: implications for sustained grazing use. En: *41st Annual Meeting of EAAP*. Toulouse, Francia. pag. 140.

Narjisse H. 1991. Feeding behaviour of goats on rangelands. En: *Goat Nutrition*. (P. Morand-Fehr ed). EAAP Publication nº 46. Holanda. 13-24.

Narjisse H., Napoleone M., Hubert B., Santucci P.M. 1991. Goat breeding and feeding systems in Mediterranean sylvo-pastoral areas. En: *Goat Nutrition*. (P. Morand-Fehr ed). EAAP Publication 46:225-239. Holanda.

Nocek J.E., Russell J.B. 1988. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *Journal of Dairy Science* 71:2070-2107.

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. *Journal of Dairy Science* 74:3598-3629.

Nozière P., Michalet-Doreau B. 1997. Effects of amount and availability of starch on amylolytic activity of ruminal solid-associated microorganisms. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73:471-476.

Nubel U., Engelen B., Felske A., Snaidr J., Weishuber A., Amann R.I., Ludwig W., Bakhaus H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs

in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 178:5636-5643.

Nunan N., Daniell T.J., Singh B.K., Papert A., McNicol J.W., Prosser J.I. 2005. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology* 71:6784-6792.

Obispo N.E., Dehority B.A. 1999. Feasibility of using total purines as a marker for ruminal bacteria. *Journal of Animal Science* 77:3084-3095.

Olfaz M., Ocak N., Erener G., Cam M.A., Garipoglu A.V. 2005. Growth, carcass and meat characteristics of Karayaka growing rams fed sugar beet pulp, partially substituting for grass hay as forage. *Meat Science* 70:7-14.

Olsen G.J., Lane D.J., Giovannoni S.J., Pace N.R., Stahl D.A. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Reviews in Microbiology* 40:337-365.

Olsen G.J., Woese C.R. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *The FASEB journal* 7:113-123.

Onodera R., Nakagawa Y., Kandatsu M. 1977. Ureolytic activity of the washed suspension of rumen ciliated protozoa. *Agriculture Biological Chemistry* 41:2177-2182.

Oregui L.M., Falagan, A. 2006. Spécificité et diversité des systèmes de production ovine et caprine dans le Bassin Méditerranéen. *Options Méditerranéennes* 70:15-21.

Orellana Boero P., Balcells J., Martín-Orúe S.M., Liang J.B., Guada J.A. 2001. Excretion of purine derivatives in cows: Endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. *Livestock Production Science* 68:243-250.

Ørskov, E.R., Flatt, W.P., Moe, P.W. 1968. Fermentation balance approach to estimate extent of fermentation and efficiency of volatile fatty acid formation in ruminants. *Journal of Dairy Science* 51:1429-1435.

Ørskov E.R. 1999. Supplement strategies for ruminants and management of feeding to maximize utilization of roughages. *Preventive Veterinary Medicine*, 38:179-185.

Ørskov E.R., Fraser C. 1975. The effects of processing of barley-based supplements on rumen pH, rate of digestion and voluntary intake of dried grass in sheep. *British Journal of Nutrition* 34:493-500.

Ørskov E.R., Ryle M. 1990. *Energy Nutrition in Ruminants*. Elsevier Applied Science, Londres, Reino Unido.133-144.

Osborn A.M., Moore E.R.B., Timmis K.N. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of

microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology* 2:39-50

Osborne J.M., Dehority B.A. 1989. Synergism in degradation and utilization of intact forage cellulose, hemicellulose, and pectin by three pure cultures of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 55:2247-2250.

Ouwerkerk D., Klieve A.V., Forster R.J. 2002. Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay. *Journal of Applied Microbiology* 92:753-758.

Owens F.N., Bergen, W.G. 1983. Nitrogen metabolism of ruminant animals: historical. *Journal of Animal Science* 57:498-518.

Owens D., McGee M., Boland T., O'Kiely P. 2008. Intake, rumen fermentation and nutrient flow to the omasum in beef cattle fed grass silage fortified with sucrose and/or supplemented with concentrate. *Animal Feed Science and Technology* 144:23-43.

Owens F.N., Secrist D.S., Hill W.J., Gill D.R. 1998. Acidosis in cattle: a review. *Journal of Animal Science* 76:275-286.

Ozutsumi Y., Tajima K., Takenaka A., Itabashi H. 2005. The effect of protozoa on the composition of rumen bacteria in cattle using 16S rRNA gene clone libraries. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69:499-506.

Ozutsumi Y., Sakamoto M., Itabashi H., Benno Y. 2008. Effect of ruminal protozoa on fecal microbiota in cattle using terminal restriction fragment length polymorphism. *Animal Science Journal* 79:29-34.

Pearson R.M., Smith J.A.B. 1943. The utilization of urea in the bovine rumen. 2. The conversion of urea to ammonia. *Biochemical Journal* 37:148-153.

Pérez J.F., Balcells J., Guada J.A., Castrillo C. 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. *British Journal of Nutrition* 75:699-710.

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) N and purine bases as microbial markers: effect of protein source and rumen bacteria isolates. *Animal Science* 65:225-236.

Pérez J.F., Balcells J., Cebrián J.A., Martín-Orúe S.M. 1998. Excretion of endogenous and exogenous purine derivatives in sheep: effect of increased concentrate intake. *British Journal of Nutrition* 79:237-240.

Pirmohammadi R., Rouzbehan Y., Rezayazdi K., Zahedifar M. 2006. Chemical composition, digestibility and in situ degradability of dried and ensiled apple pomace and maize silage. *Small Ruminant Research* 66:150-155.

Pitt R.E., Van Kessel J.S., Fox D.G., Pell A.N., Barry M.C., Van Soest P.J. 1996. Prediction of ruminal volatile fatty acids and pH within the net carbohydrate and protein system. *Journal of Animal Science* 74:226-244.

Pralomkarn W., Kochapakdee S., Saithanoo S., Norton B.W. 1995. Energy and protein utilisation for maintenance and growth of Thai native and Anglo-Nubian x Thai native male weaner goats. *Small Ruminant Research* 16:13-20.

Prieto C., Aguilera J.F., Lara L., Fonollá J. 1990. Protein and energy requirements for maintenance of indigenous Granadina goats. *British Journal of Nutrition* 63:155-163.

Prigge E.C., Baker M.J., Varga G.A. 1984. Comparative digestion, rumen fermentation and kinetics of forage diets by steers and wethers. *Journal of Animal Science* 59:237-245.

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. *Journal of Dairy Science* 87:3473-3479.

Ranilla M.J., Tejido M.L., Carro M.D., 2001. Comparación de diversos métodos de desligamiento de bacterias ruminales asociadas a la fase sólida de la digesta en un sistema *in vitro* (Rusitec). *ITEA* 22:382-384.

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. *Journal of Animal Science* 81:537-544.

Rappe, M.S., Giovannoni, S.J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology* 57:369-394.

Raskin L., Capman W.C., Sharp R., Stahl D.A. 1997. Molecular ecology of gastrointestinal ecosystems. En: *Gastrointestinal Microbiology and Host Interactions*, Vol. 2. R.I. Mackie, B.A. White, B.A., R.E. Isaacson eds). Chapman & Hall. Nueva York. pp. 243-298.

Rasmussen, R.P. 2001. Quantification on the Light Cycler. En: *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications* (S. Meuer, C.T. Wittwer, K. Nakagawara eds). Springer Press, Heidelberg. 21-34.

Regensbogenova M., Pristas P., Javorsky P., Moon-van der Staay S.Y., van der Staay G.W.M., Hackstein J.H.P., Newbold C.J., McEwan N.R. 2004. Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE. *Letters in Applied Microbiology* 39:144-147.

Reid R.L., Jung G.A., Cox-Ganser J.M., Rybeck B.F., Townsend E.C. 1990. Comparative utilization of warm-and cool-season forages by cattle, sheep and goats. *Journal of Animal Science* 68:2986-2994.



Reynal S.M., Broderick G.A., Ahvenjarvi S., Huhtanen P. 2003. Effect of feeding protein supplements of differing degradability on omasal flow of microbial and undegraded protein. *Journal of Dairy Science* 86:1292-1305.

Reynal S.M., Broderick G.A. 2005. Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88:4045-4064.

Reynal S.M., Broderick G.A. 2009. Technical note: A new high-performance liquid chromatography purine assay for quantifying microbial flow. *Journal of Dairy Science* 92:1177-1181.

Reynolds L. 1981. Nitrogen metabolism in indigenous Malawi goats. *The Journal of Agricultural Science* 96:347-351.

Richards D.E., Brown W.F., Ruegsegger G., Bates D.B. 1994. Replacement value of tree legumes for concentrates in forage based diets. II. Replacement value of *Leucaena leucocephala* and *Gliricidia sepium* for lactating goats. *Animal Feed Science and Technology* 46:53-65.

Robinson P.H., Chalupa W., Sniffen C.J., Julien W.E., Sato H., Watanabe K., Fujieda T., Suzuk, H. 1998. Ruminally protected lysine or lysine and methionine for lactating dairy cows fed a ration designed to meet requirements for microbial and postruminal protein. *Journal of Dairy Science* 81:1364-1373.

Rodríguez C.A., González J., Alvir M.R., Repetto J.L., Centeno C., Lamrani F. 2000. Composition of bacteria harvested from the liquid and solid fractions of the rumen of sheep as influenced by feed intake. *British Journal of Nutrition* 84:369-376.

Rodríguez-Prado M., S. Calsamiglia, Ferret A. 2004. Effects of fiber content and particle size of forage on the flow of microbial amino acids from continuous culture fermenters. *Journal of Dairy Science* 87:1413-1424.

Roselló-Mora R., Amann R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiological Reviews* 25:39-67.

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. *Journal of Animal Science* 84:1188-1196.

Rumosa Gwaze F., Chimonyo M., Dzama K. 2008. Communal goat production in Southern Africa: a review. *Tropical Animal Health and Production*. doi 10.1007/s11250-008-9296-1

Russell J.B., Wallace R.J. 1997. Energy-yielding and energy-consuming reactions. En: *The rumen microbial ecosystem*. (P. N. Hobson, C. S. Stewart ed), 2nd ed. Blackie, Londres, Reino Unido. pp. 246-282

- Russell J.B. 1991. Intracellular pH of acid-tolerant ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57:3383-3384.
- Russell J.B., Dombrowski D.B. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology* 39:604-610.
- Russell J.B., Cotta M.A., Dombrowski D.B. 1981. Rumen bacterial competition in continuous culture: *Streptococcus bovis* versus *Megasphaera elsdenii*. *Applied and Environmental Microbiology* 41:1394-1399.
- 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. *Journal of Animal Science* 70:3551-3561.
- Russell J.B., Wilson D.B. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *Journal of Dairy Science* 79:1503-1509.
- 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.
- Salem A.Z.M., Salem M.Z.M., El-Adawy M.M., Robinson P.H. 2006. Nutritive evaluations of some browse tree foliages during the dry season: Secondary compounds, feed intake and *in vivo* digestibility in sheep and goats. *Animal Feed Science and Technology* 127:251-267.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sánchez Rodríguez M., López Baldán D., Santos Alcudia R., Martín Martín C. C. 2002. Situación de la producción de leche de cabra en España. *Mundo Ganadero* 146, 37-43.
- Santini F.J., Lu C.D., Potchoiba M.J., Fernandez J.M., Coleman S.W. 1992. Dietary fiber and milk yield, mastication, digestion, and rate of passage in goats fed alfalfa hay. *Journal of Dairy Science* 75:209-219.
- Santoso B., Mwenya B., Sar C., Takahashi J. 2006. Ruminal fermentation and nitrogen metabolism in sheep fed a silage-based diet supplemented with *Yucca schidigera* or *Y. schidigera* and nisin. *Animal Feed Science and Technology* 129:187-195.
- Satter L.D., Slyter L.L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *British Journal of Nutrition* 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. *Journal of Animal Science* 77:485-491.

Schniffen C.J., Robinson P.H. 1987. Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulation. *Journal of Dairy Science* 70:425-441.

Schütte U.M.S., Abdo Z., Bent S.J., Shyu C., Williams C.J., Jacob J.D., Forney L.J. 2008. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Applied Microbiology and Biotechnology* doi:10.1007/s00253-008-1565-4

Seeling K., Boguhn J., Strobel E., Dänicke S., Valenta H., Ueberschär K.H., Rodehutsord M. 2006. On the effects of Fusarium toxin contaminated wheat and wheat chaff on nutrient utilisation and turnover of deoxynivalenol and zearalenone *in vitro* (Rusitec). *Toxicology in vitro* 20:703-711.

Shannon C. E., Weaver W. 1963. The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois Press, Urbana, 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. *Applied and Environmental Microbiology* 58:2583-2591.

Shriver B.J., Hoover W.H., Sargent J.P., Crawford Jr R.J., Thayne W.V. 1986. Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. *Journal of Dairy Science* 69:413-419.

Shyu C., Soule T., Bent S.J., Foster J.A., Forney L.J. 2007. MiCA: A Web-Based Tool for the Analysis of Microbial Communities Based on Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphisms of 16S and 18S rRNA Genes. *Microbial Ecology* 53:562-570.

Silanikove N., Gilboa N., Perevolotsky A., Nitsan, Z. 1996. Goats fed tannin-containing leaves do not exhibit toxic syndromes. *Small Ruminant Research* 21: 195-201.

Simpson J.M., Kocherginskaya S.A., Aminov R.I., Skerlos L.T., Bradley T.M., Mackie R.I., White B.A. 2002. Comparative microbial diversity in the gastrointestinal tracts of food animal species. *Society for Integrative and Comparative Biology* 42:327-331.

Simpson J.M., McCracken V.J., White B.A., Gaskins H.R., Mackie R.I. 1999. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *Journal of Microbiological Methods* 36:167-179.

Slyter L.L., Nelson W.O., Wolin M.J. 1964. Modifications of a device for maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology* 12:374-377.

Smalla K., Oros-Sichler M., Milling A., Heuer H., Baumgarte S., Becker R., Neuber G., Kropf S., Ulrich A., Tebbe C.C. 2007. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods* 69:470-479.

Smith R.H. 1975. Nitrogen metabolism in the rumen and the composition and nutritive value of nitrogen compounds entering the duodenum. En: *Digestion and Metabolism in the Ruminant*. (W. McDonald, A.C.I. Warner eds) New England University. Publishing Unit, Armidale, Australia. 399-415.

Smith R.H., Mcallan A.B., Hewit D., Lewis P.E. 1978. Estimation of amounts of microbial and dietary nitrogen compounds entering the duodenum of cattle. *Journal of Agricultural Science* 90:557-568.

Sniffen C.J., Russell J.B., Van Soest P.J. 1983. The influence of carbon source, nitrogen source and growth factors on rumen microbial growth factor in rumen microbial growth. *Proceedings Cornell Nutrition Conference*. Ithaca, NY: 26-33.

Soder K.J., Saporito L.S., Stout W.L. 2007. Effect of by-product gypsum application rate to grass pasture, grass hay, and corn silage on fermentation by rumen microorganisms in continuous culture. *Animal Feed Science and Technology* 132:331-340.

Soto-Navarro S.A., Goetsch A.L., Sahlu T., Puchala R. 2006. Effects of level and source of supplemental protein in a concentrate-based diet on sites of digestion and small intestinal amino acid disappearance in Boerx Spanish wether goats. *Small Ruminant Research* 65:85-100.

Spörndly E. 1989. Effects of diet on milk composition and yield of dairy cows with special emphasis on milk protein content. *Swedish Journal of Agriculture Research* 19:99-106.

Steffan R.J., Atlas R.M. 1991. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. *Annual Reviews in Microbiology* 45:137-161.

Stern M.D., Varga G.A., Clark J.H., Firkins J.L., Huber J.T., Palmquist D.L. 1994. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* 77:2762-2786.

Stewart C.S., Flint H.J., Bryant M.P. 1997. The rumen bacteria. En: *The rumen microbial ecosystem*. (P.N. Hobson, C.S. Stewart eds). Chapman and Hall. Londres, Reino Unido. 10-72.

Strobel E., Seeling K., Tebbe C.C. 2008. Diversity responses of rumen microbial communities to Fusarium-contaminated feed, evaluated with rumen simulating technology. *Environmental Microbiology* 10:483-496.

Sylvester J.T., Karnati S.K.R., Yu Z., Morrison M., Firkins J.L. 2004. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. *Journal of Nutrition* 134:3378-3384.

Sylvester J.T., Karnati S.K.R., Yu Z., Newbold C.J., Firkins J.L. 2005. Evaluation of a real-time PCR assay quantifying the ruminal pool size and duodenal flow of protozoal nitrogen. *Journal of Dairy Science* 88:2083-2095.

Tajima K., Aminov R.I., Nagamine T., Matsui H., Nakamura M., Benno Y. 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2766-2774.

Tajima K., Aminov R.I., Nagamine T., Ogata K., Nakamura M., Matsui H., Benno Y. 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology* 29:159-169.

Tajima K., Arai S., Ogata K., Nagamine T., Matsui H., Nakamura M., Aminov R.I., Benno Y. 2000. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe* 6:273-284.

Tamminga S. 1979. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *Journal of Animal Science* 49:1615-1630.

Tapia M.O., Koski R.L., Bach A., Murphy M.J. 2002. Effects of patulin on rumen microbial fermentation in continuous culture fermenters. *Animal Feed Science and Technology* 97:239-246.

Tappeiner H. 1884. Untersuchungen über die garung der cellulose, insbesondere ber deren lsung im darmkanal. *Zeit f. Biol.* 20:52-134

Tas B.M., Susenbeth A. 2007. Urinary purine derivatives excretion as an indicator of *in vivo* microbial N flow in cattle: A review. *Livestock Science* 111:181-192.

Teather R.M., Sauer F.D. 1988. A naturally compartmented rumen simulation system for the continuous culture of rumen bacteria and protozoa. *Journal of Dairy Science* 71:666-673.

Terroine E.F., Mourot G. 1931. Allantoine et les corps puriques de l'urine des mammiferes proviennent-ils partiellement de la degradation des matieres protiques?. *Bulletin de la Societ de Chimie Biologique* 23:94-109.

Theodorou M.K., France J. 1993. Rumen microorganisms and their interactions. En: *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. (J.M. Forbes, J. France eds). CAB International, Wallingford, Reino Unido. 145-162.

Tisserand J.L., Bellet B., Masson C., Cordelet C., Faurie F. 1986. Effet du traitement des fourrages par la soude sur la composition de l'écosystème microbien du rumen des ovins et des caprins. *Reproduction Nutrition Développement* 26:313-314.

Titgemeyer E.C. 1997. Design and interpretation of nutrient digestion studies. In. *Journal of Animal Science* 75:2235-2247.

Titgemeyer E.C., Merchen N.R., Berger L.L. 1989. Evaluation of soybean meal, corn gluten meal, blood meal and fish meal as sources of nitrogen and amino acids disappearing from the small intestine of steers. *Journal of Animal Science*, 67:262-275.

Thran B.H., Hussein H.S., Redelman D., Fernandez G.C.J. 2003. Influence of pH treatments on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in continuous cultures of Rumen Contents. *Experimental Biology and Medicine* 228:365-369.

Tolkamp B.J., Brouwer O. 1993. Statistical review of digestion in goats compared with other ruminants. *Small Ruminant Research* 11:107-123.

Topps J.H., Elliott R.C. 1965. Relationship between concentrations of ruminal nucleic acids and excretion of purine derivatives by sheep. *Nature* 205:498-499.

Tovar-Luna I., Goetsch A.L., Puchala R., Sahlu T., Carstens G.E., Freetly H.C., Johnson Z.B. 2007. Effects of moderate feed restriction on energy expenditure by 2-year-old crossbred Boer goats. *Small Ruminant Research* 72:25-32.

Tripathi M.K., Chaturvedi O.H., Karim S.A., Singh V.K., Sisodiya S.L. 2007. Effect of different levels of concentrate allowances on rumen fluid pH, nutrient digestion, nitrogen retention and growth performance of weaner lambs. *Small Ruminant Research* 72:178-186.

Trung L.T., Devendra C. 1987. Options for increasing the utilization of cereal straws. En: *Proceedings IV International Conference on Goats*. Brazilia, Brazil. 1161-1183.

Tufarelli V., Dario M., Laudadio V. 2009. Forage to concentrate ratio in Jonica breed goats: influence on lactation curve and milk composition. *Journal of Dairy Research* 76:124-128.

Ushida K., Jouany J.O., Thivend P. 1986. Role of rumen protozoa in nitrogen digestion in sheep given two isonitrogenous diets. *British Journal of Nutrition* 565:407-419.

Vacas Fernández C. 2003. Evolución del sector caprino en la Región de Murcia (1986-2000) y su caracterización productiva al final del milenio. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

Vagnoni D.B., Broderick G.A., Clayton M.K., Hatfield R.D. 1997. Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amounts of purines. *Journal of Dairy Science* 80:1695-1702.

Valadares R.F.D., Broderick G.A., Filho S.C.V., Clayton M.K. 1999. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis

estimated from excretion of total purine derivatives. *Journal of Dairy Science* 82:2686-2696.

Vallaeyts T., Topp E., Muyzer G., Macheret V., Laguerre G., Rigaud A., Soulas G. 1997. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology* 24:279-285.

Van Soest P.J. 1982. Nutritional ecology of the ruminant: ruminant metabolism, nutritional strategies, the cellulolytic fermentation and the chemistry of forages and plant fibers. O & B Books, Corvallis, Oregon.

Varga G.A., Kolver E.S. 1997. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. *Journal of Nutrition* 127:819S-823.S

Vasta V., Nudda A., Cannas A., Lanza M., Priolo A. 2008. Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 147:223-246.

Veira D.M. 1986. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. *Journal of Animal Science* 63:1547-1560.

Verbic J., Chen X.B., MacLeod N.A., Ørskov E.R. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *Journal of Agricultural Science* 114: 243-248.

Verite R., Dulphy J.P. 1981. Effets de la nature de l'aliment concentré sur l'ingestion et les performances des vaches laitières. Bull. Tech. C.R.Z.V. Theix, INRA 45:15-21

Vicente F., Guada J.A., Surra J., Balcells J., Castrillo C. 2004. Microbial contribution to duodenal purine flow in fattening cattle given concentrate diets, estimated by purine N labelling (<sup>15</sup>N) of different microbial fractions. *Animal Science* 78:159-167.

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. *Journal of Dairy Science* 89:2668-2678.

Vlaeminck B., Fievez V., Demeyer D., Dewhurst R.J. 2007. Effect of variation in the proportion of solid-and liquid-associated rumen bacteria in duodenal. *Journal of Animal and Feed Sciences* 16:37-42.

Wintzingerode F., Gobel U.B., Stackebrandt E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21:213-229.

Wainman F.W., Dewey P.J.S., Boyne A.W. 1981. *Compound feeding stuffs for ruminants*. Rowett Research Institute for the Feedingstuffs Evaluation Unit.

Wales W.J., Kolver E.S., Thorne P.L., Egan A.R. 2004. Diurnal variation in ruminal pH on the digestibility of highly digestible perennial ryegrass during continuous culture fermentation. *Journal of Dairy Science* 87:1864-1871.

Wales W.J., Kolver E.S., Egan A.R. 2009. Digestion during continuous culture fermentation when replacing perennial ryegrass with barley and steam-flaked corn. *Journal of Dairy Science* 92:189-196.

Wallace R.J. 1996. Ruminal microbial metabolism of peptides and amino acids. *Journal of Nutrition* 126:1326S-1334S.

Wallner G., Fuchs B., Spring S., Beisker W., Amann R. 1997. Flow sorting of microorganisms for molecular analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4223-4231.

Wang Y.H., Xu M., Wang F.N., Yu Z.P., Yao J.H., Zan L.S., Yang F.X. 2009. Effect of dietary starch on rumen and small intestine morphology and digesta pH in goats. *Livestock Science* 122:48-52.

Warner A.C. 1956. Criteria for establishing the validity of *in vitro* studies with rumen micro-organisms in so-called artificial rumen systems. *Journal of General Microbiology* 14:733-748.

Weimer P.J., Waghorn G.C., Odt C.L., Mertens D.R. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82:122-134.

Weston R.H., Hogan J.P. 1968. The digestion of pasture plants by sheep. I. Ruminal production of volatile fatty acids by sheep offered diets of ryegrass and forage oats. *Australian Journal of Agricultural Research* 19:419-432.

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. *Journal of Animal Science*, 72:1335-1343.

Whitelaw F.G., Eadie J.M., Bruce L.A., Shand W.J. 1984. Methane formation in faunated and ciliate-free cattle and its relationship with rumen volatile fatty acid proportions. *British Journal of Nutrition* 52:261-275.

Whitford M.F., Forster R.J., Beard C.E., Gong J., Teather R.M. 1998. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe* 4:153-163.

Williams A.G., Withers S.E., Strachan N.H. 1989. Postprandial variations in the activity of polysaccharide-degrading enzymes in microbial populations from the digesta solids and liquor fractions of rumen contents. *Journal of Applied Microbiology* 66:15-26.



Wise M.J., Osborn A.M. 2001. TRUFFLER: programs to study microbial community composition and flux from fluorescent DNA fingerprinting data. En: *Bioinformatics and Bioengineering Conference, 2001. Proceedings of the IEEE 2nd International Symposium*. pp. 129-135.

Woese C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 51:221-271.

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. *Journal of Agricultural Science* 28:43-63.

Yanagita K., Kamagata Y., Kawaharasaki M., Suzuki T., Nakamura Y., Minato H. 2000. Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of *Methanomicrobium mobile* by fluorescence in situ hybridization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64:1737-1742.

Yáñez Ruiz D.R. 2003. Utilización digestiva de dietas a base de orujo de dos fases y hoja de olivo en ovino y caprino. Efecto de factores no nutritivos. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.

Yáñez Ruiz D.R., Moumen A., Martín García A.I., Molina Alcaide E. 2004a. Ruminant fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: Effect of PEG supply. *Journal of Animal Science* 82:2023-2032.

Yáñez Ruiz D.R., Martín García A.I., Moumen A., Molina Alcaide E. 2004b. Ruminant fermentation and degradation patterns, protozoa population and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on olive leaves. *Journal of Animal Science* 82:3006-3014.

Yáñez Ruiz D.R., Scollan N.D., Merry R.J., Newbold C.J. 2006. Contribution of rumen protozoa to duodenal flow of nitrogen, conjugated linoleic acid and vaccenic acid in steers fed silages differing in their water-soluble carbohydrate content. *British Journal of Nutrition* 96:861-869-

Yáñez Ruiz D.R., Molina Alcaide E. 2007. A comparative study of the effect of two-stage olive cake added to alfalfa on digestion and nitrogen losses in sheep and goats. *Animal* 1:227-232.

Yang W.Z., Beauchemin K.A., Rode L.M. 2001. Effects of grain processing, forage to concentrate ratio, and forage particle size on rumen pH and digestion by dairy cows. *Journal of Dairy Science* 84:2203-2216.

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. *Animal Feed Science and Technology* 102:137-150.

Yang W.Z., Beauchemin K.A., Vedres D.D., Ghorbani G.R., Colombatto D., Morgavi D.P. 2004. Effects of direct-fed microbial supplementation on ruminal acidosis, digestibility, and bacterial protein synthesis in continuous culture. *Animal Feed Science and Technology* 114:179-193.

Yasuda M., Shiaris M.P. 2005. Differentiation of bacterial strains by thermal gradient gel electrophoresis using non-GC-Clamped PCR primers for the 16S-23S rDNA intergenic spacer region. *FEMS Microbiology Letters* 243:235-242.

Yotopoulos P.A. 1985. Middle-income classes and food crises: The "new" food-feed competition. *Economic Development and Cultural Change* 33:463-483.

Ziemer C.J., Sharp R., Stern M.D., Cotta M.A., Whitehead T.R., Stahl D.A., Usda A.R.S. 2000. Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S ribosomal RNA-targeted probes. *Environmental Microbiology* 2:632-643.

Zinn R.A., Owens F.N. 1986. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. *Canadian Journal of Animal Science* 66:157-166.

Zoetendal E.G., Akkermans A.D.L., De Vos W.M. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3854-3859.

Zoetendal E.G., Collier C.T., Koike S., Mackie R.I., Gaskins H.R. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A Review. *Journal of Nutrition* 134:465-472.

Zoetendal E.G., von Wright A., Vilpponen-Salmela T., Ben-Amor K., Akkermans A.D.L., de Vos W.M. 2002. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3401-3407.

Zuckerandl E., Pauling L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology* 8:357-366.