

77/58

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 07.06.03
ENTRADA NUM. 1950

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 613657574
N.º Copia 15731480

TESIS DOCTORAL

**VALORACIÓN NUTRITIVA, MEDIANTE TÉCNICAS DE
SIMULACIÓN, DE DIETAS PARA PEQUEÑOS
RUMIANTES BASADAS EN ORUJO DE DOS FASES U
HOJA DE OLIVO. POTENCIAL PREDICTIVO.**

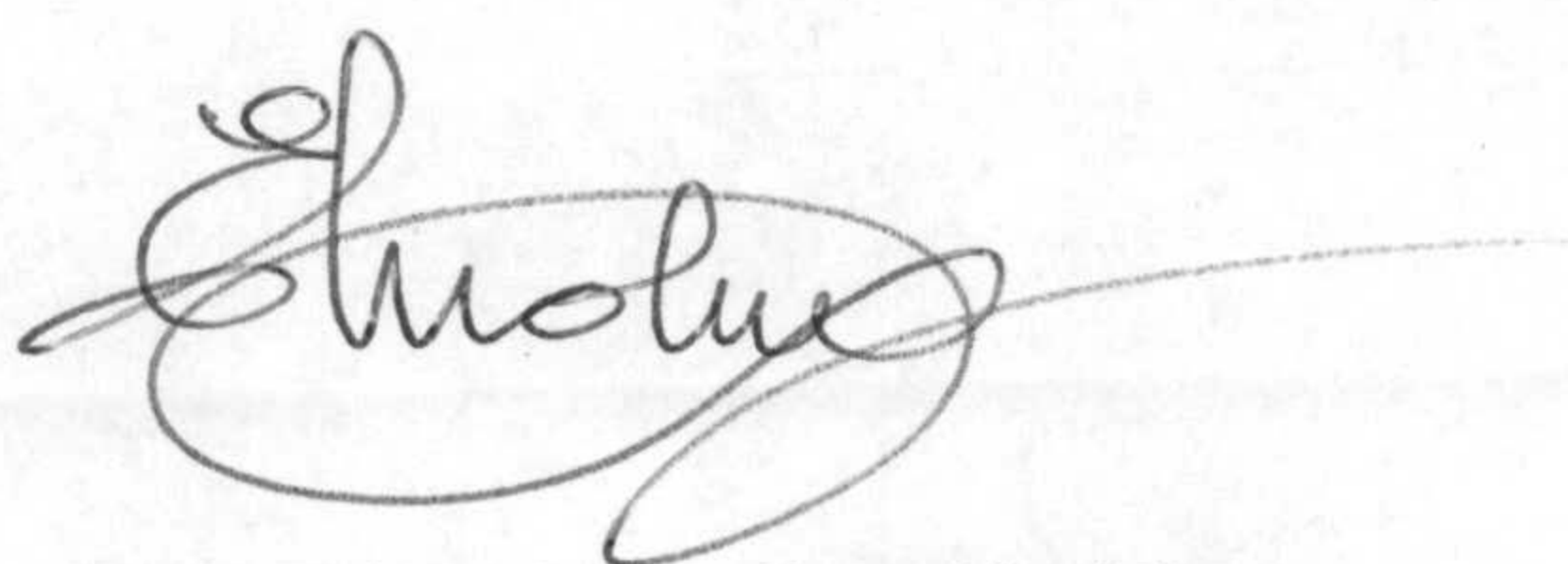


UNIVERSIDAD DE GRANADA
21 MAYO 2003
COMISION DE DOCTORADO

ABDELMAJID MOUMEN
Unidad de Nutrición Animal
Estación Experimental del Zaidín (CSIC)
Granada, 2003

Las actividades incluidas en esta memoria de Tesis Doctoral se han realizado en el marco de los siguientes proyectos de investigación: OLI96-2162-CO2-01 (CICYT), IFD97-0795 (CICYT-FEDER) y AGL2001-0941-C02-01 (CICYT)

Los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral, titulada *“Valoración nutritiva, mediante técnicas de simulación, de dietas para pequeños rumiantes basadas en orujo de dos fases u hoja de olivo. Potencial predelectivo”*, han sido realizados bajo mi dirección y en la Unidad de Nutrición Animal de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada) por el Licenciado Abdelmajid Moumen para aspirar al grado de Doctor en Biología. Esta memoria refleja fielmente los resultados obtenidos.

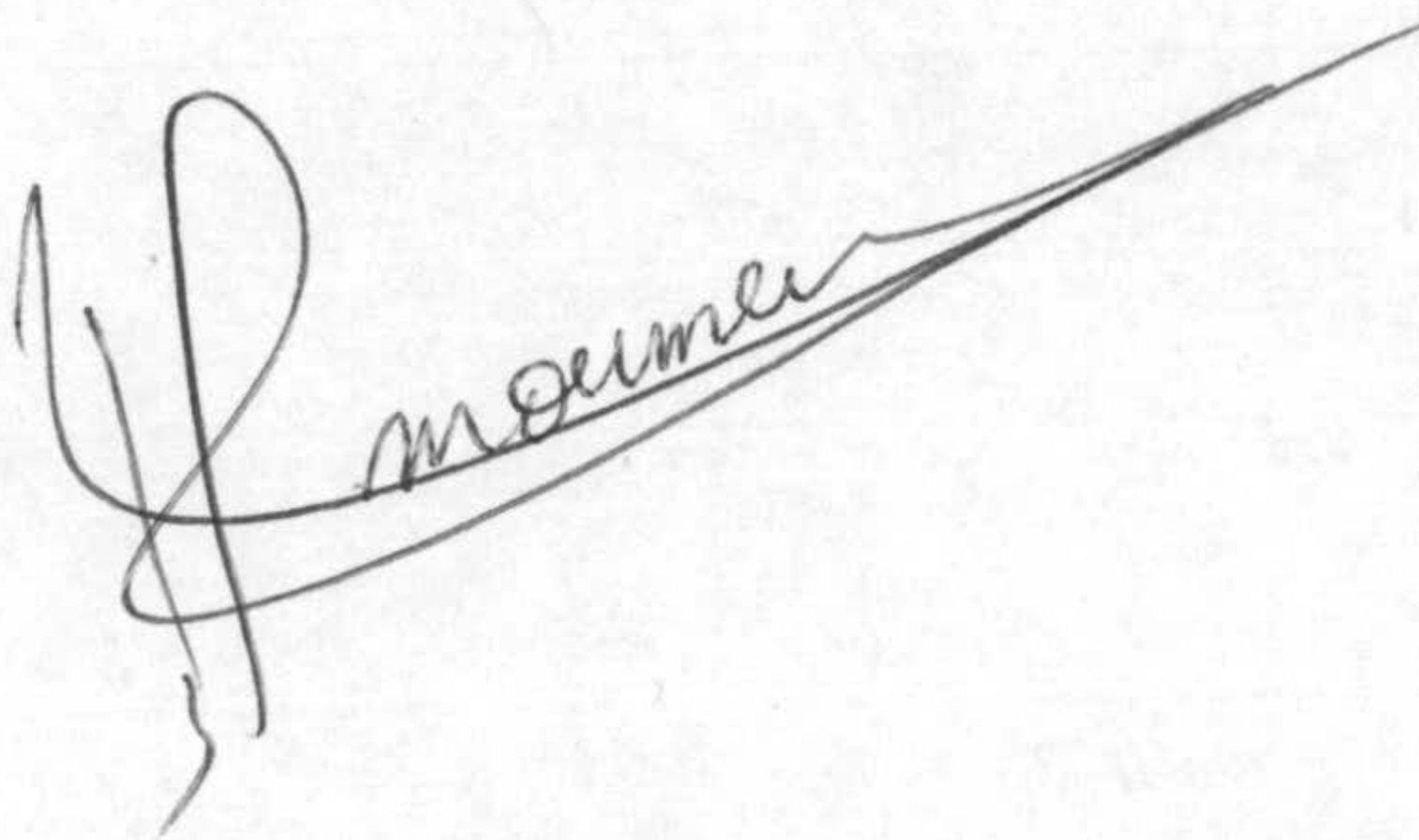


Dra. Eduarda Molina Alcaide

Unidad de Nutrición Animal

Estación Experimental del Zaidín (CSIC)

Granada.



Licenciado Abdelmajid Moumen

Granada, 2003.

Parte de los resultados expuestos en la presente Memoria de Tesis Doctoral han sido presentados y publicados en:

- 7th International conference on Goats: FAO. CIHEAM. Tours, France (2000).
- Gestión de Residuos Orgánicos en el Ámbito Rural. Cátedra Zurich de Medio Ambiente. Universidad de Navarra, Pamplona (2001).
- MERCACEI, 30, 162-164 (2002).
- I Jornadas de Investigación y Transferencia de Tecnología al Sector Oleícola. 207-210. Córdoba (2002).

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mi directora, la doctora Eduarda Molina Alcaide, por su plena confianza en mí, su apoyo y colaboración activa en todas las etapas de este trabajo, por ofrecerme todo lo que “necesitaba” de ella, desde trabajar para sacar una Tesis hasta ingresarme en el hospital, pasando por ofrecerme alojamiento. Ha ejercido de todo: de directora, de madre, de hermana.

A mi Tutor Dr. José Miguel Ávila Sánchez-Jofré, si no fuese por él no me habrían dado “el visado del consulado”.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional, por concederme una beca predoctoral.

A la orujera El Tejar, por suministrarnos el orujo y, a la Almazara Romeroliva S.L., por la hoja de olivo.

A la estación Experimental del Zaidín, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Granada y al Departamento de Nutrición Animal, por los medios que han propuesto a nuestra disposición para la realización de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada por acogerme.

Al personal científico de la Unidad de Nutrición Animal, a todos y a cada uno, por ayudarme cuando lo he necesitado. A Julio Boza, por decirme “Dios te bendiga” y, al mismo tiempo llamarme “Mohamed”. A Pepe Aguilera, a pesar de sus cerdos. Él fue el primero que me “entrevistó” y “acertó” cuando me mandó al grupo de Rumiantes de Eduarda Molina Alcaide, pero...(!vaya que maravillosos años!). A Remedio Sanz, por permitirme utilizar su Berlingo a pesar de las “consecuencias” (piloto roto, pared enganchada a la puerta...). A Matilde Rodríguez, por dejar que su agitador “saliese del armario” para ayudarme. A Pilar Navarro, por dejarse aconsejar para distinguir el “sexo” de los nombres musulmanes. A Manolo Lachica, por ser tan tímido como yo. A Luis Rubio, Rosa Nieto e Ignacio Fernández-Fígares, por sus constante consejos en mi trabajo en el HPLC. A Isabel Seiquer, por sus consejos gastronómicos.

A Luis Lara por ayudarme a los tratamientos estadísticos.

A mis compañeros “padrinos” Ignacio Martín García y David Yáñez Ruiz, por ayudarme en todo lo que he necesitado desde charlas en todos los idiomas (Español, Francés, Inglés, Árabe, Bereber) hasta como resolver problemas con los fermentadores y con los jefes, pasando por debates sobre religión y por pegar unos a otros sustos en los momentos de concentración. A “madmoiselle...” y a ese fatalísimo día. A las frases “no lo entiendo ni yo”, “¿y que pasa con los resultados de David?”, “a continuación” y “los chicos de Edu”. A los antiguos “combatientes” de esta unidad: Mara, Begoña, Cristina, Juanjo, Dani, Marta, Roberto, Fernando, y a los recién llegados: José, Eva, David, Gloria, Sonia. (Ánimo chic@s, esto parece no tiene fin)

A Francisca Gil por sonreírme siempre y a Encarnación Colmenero, por interesarse por mi “estado civil”; gracias a las dos por ayudarme en el laboratorio. A M^a Carmen Sánchez por enseñarme en el laboratorio y también por preocuparse por mi salud al buscarme un buen traumatólogo, ah! por cierto agradezco también a López Gollonet por dejarme dos veces inmóvil. A Luis Del Boz por obligarme a tomar el café por la mañana y a Encarna por echarme una mano para escribir las referencias bibliográficas. A Angeles y a Inma, por enseñarme a ser un hombre “apañado”.

A Paco Fúnez, por ayudarme cuando he necesitado “fuerza” para manejar a los animales. A Juan Vera, por echarme una mano cuando se trataba de problemas técnicos de los aparatos. A Matilde Barón y a sus becarias que a pesar de su “sensible olfato” me ofrecieron sus congeladores para guardar mis muestras....y...., a su bonita frase “Abdel, todo lo que toques y uses no lo dejes aquí, sino llévatelo contigo a Armilla”. Al personal encargado de centrífugas, porque... más de uno, al entrar en la sala decía “uffff, ¿a que huele?, abre las ventanas...” y yo: “Alá, tierra trágame” y a la gente que venía detrás de mí para centrifugar

y que ponían en el libro Guinness de centrífugas “la centrífuga huele fatal”. Ninguno sabía que se trataba de un perfume muy especial “Jus du rumen”.

A todo el personal contratado y en prácticas, que han colaborado en este trabajo. Al personal de seguridad, Pedro, Antonio y José, por abrirme la puertaa cualquier momento del día o de la noche diciendo: “Abdel, no te preocupes, que no pasa nada”.

A las autoridades del gobierno por renovarme la tarjeta de residencia en España cada año.

A Ali en France, Mourad en Sweeden, Youssef en Granada.

A “Internet Elvira” por pasarme allí mi “tiempo libre”: chatear, consultar el mundo de información...

A mis amigos del piso por aguantarme el periodo de “luto”, por no encender la radio, por ver nada más que imágenes en la tele sin voz, por ir al servicio sin chanclas....

A la memoria de mí padre, a mi madre por apoyarme económicamente y moralmente y siempre cuando me preguntaba: “ewa, ¿cuando terminas?” yo la respondía: “Mamá, casi, casi, Inchaalah”. A mis herman@s, sobre todo a mí hermana Zoulikha que está en Francia, que me ayudó en todos los aspectos (dinero, billete de ida y vuelta para visitarla...), incluso a buscarme una novia, pero todavía no la consiguió. A mi hermana Zineb que está en Agadir, por ofrecerme una semana de vacaciones a mí y a mí jefa, cuando termine. A mi hermana Fátima que esta en Nador, por ofrecerme unas comidas buenísimas cuando iba a visitarla, y a sus maridos (Ahmed, Mohamed y Mohamed, respectivamente). A mis hermanos por ofrecerme su apoyo (Omar, Mouhyeddine, El ouardani y Baghdad) a sus mujeres (Fatouma y Hoiariya) y a mis sobren@s. A mí Tío Tohami, su mujer y a sus hij@s y, a Soraya. A Granada, la tierra de las culturas, y a todos, muchas Gracias.

*A la memoria de mí padre
A mí madre
A mis hermanas y hermanos*

ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.	21
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	27
2.1	LOS SUBPRODUCTOS DE LA AGROINDUSTRIA OLIVARERA Y SU IMPORTANCIA EN LA NUTRICIÓN DE RUMIANTES.	27
2.1.1.	Breve introducción histórica sobre el olivo.	27
2.1.2.	Hoja de olivo.	28
2.1.3.	Orujo de aceituna.	30
2.2.	MICROORGANISMOS RUMINALES.	31
2.3.	COMPUESTOS FENÓLICOS. EFECTOS SOBRE LA MICROBIOTA RUMINAL.	33
2.3.1.	Interacción de los taninos con proteínas y carbohidratos.	35
2.3.2.	Efecto de los taninos sobre la microbiota ruminal.	37
2.3.3.	Mecanismos de adaptación de la microbiota ruminal a la presencia de taninos en la dieta del rumiante.	39
2.3.4.	Efecto de la adición de PEG sobre la fermentación ruminal.	42
2.4.	SUPLEMENTACIÓN DE DIETAS POBRES EN CARBOHIDRATOS FERMENTABLES Y NITRÓGENO.	43
	<i>Suplementación con fuentes de nitrógeno</i>	43
	<i>Suplementación con alimentos ricos en carbohidratos solubles.</i>	45
2.5.	CAPACIDADES FERMENTATIVAS DEL RUMEN DE OVINO Y CAPRINO.	47
2.6.	TÉCNICAS DE SIMULACIÓN.	50
2.6.1	Breve historia de la evolución de las técnicas de simulación.	50
2.6.2.	Potencialidad de las técnicas de simulación para la valoración nutritiva de alimentos para rumiantes.	52
2.7.	TÉCNICAS DE VALORACIÓN NUTRITIVA.	58
2.7.1.	Degradación de la proteína del alimento en el fermentador.	58
2.7.2.	Síntesis de proteína microbiana en fermentadores.	61
2.7.2.1.	Marcadores microbianos.	62
2.7.2.1.1.	Ácido diaminopimélico (DAPA).	63
2.7.2.1.2.	Ácidos nucleicos.	65
2.7.2.2.	Características de la microbiota en los fermentadores.	67
2.7.2.3.	Factores que afectan a la síntesis de proteína microbiana.	71
2.7.3.	Digestibilidad en el intestino delgado de la proteína del alimento no degradada.	76
2.7.4.	Sistema de Valoración Proteica de Alimentos para Rumiantes AAT-PBV.	78
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.	83
3.1.	MATERIAS PRIMAS: OBTENCIÓN, PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.	83
3.1.1.	Orujo de aceituna.	83
3.1.2.	Hoja de olivo.	83
3.2.	ANIMALES EXPERIMENTALES.	85
3.2.1.	Construcción de cánulas ruminales.	85
3.2.2.	Implantación quirúrgica de cánulas ruminales.	85

3.3.	TÉCNICAS EXPERIMENTALES.	86
3.3.1.	Digestibilidad intestinal <i>in vitro</i> .	86
3.4.	ENSAYOS CON FERMENTADORES DE FLUJO CONTINUO.	88
3.4.1.	Dietas experimentales.	88
3.4.2.	Procedimiento experimental.	89
3.4.2.1.	Degradabilidad <i>in sacco</i> .	92
3.4.2.2.	Recuento e identificación de protozoos.	93
3.4.2.3.	Aislamiento de bacterias.	94
3.4.2.3.1.	En los efluentes.	94
3.4.2.3.2.	En los contenidos de los vasos de fermentación.	95
3.5.	TÉCNICAS ANALÍTICAS.	96
3.5.1.	Materia seca.	96
3.5.2.	Materia orgánica.	96
3.5.3.	Extracto etéreo.	96
3.5.4.	Energía bruta.	96
3.5.5.	Componentes fibrosos.	97
3.5.5.1.	Fibra neutro detergente (FND).	98
3.5.5.2.	Fibra ácido detergente (FAD).	98
3.5.5.3.	Lignina ácido detergente (LAD).	98
3.5.6.	Componentes nitrogenados	99
3.5.6.1	Proteína bruta.	99
3.5.6.2.	Nitrógeno asociado a la fracción lignocelulósica (N-FAD).	99
3.5.6.3.	Nitrógeno aminoacídico.	99
3.5.6.4.	Nitrógeno amoniacal.	103
3.5.6.5.	Bases púricas.	103
3.5.7.	Determinación de pH.	104
3.5.8.	Ácidos grasos volátiles.	105
3.5.9.	Extracción de taninos condensados.	105
3.5.9.1.	Extracción de los taninos condensados libres.	106
3.5.9.2.	Extracción de los taninos condensados ligados a la proteína.	107
3.5.9.3.	Extracción de los taninos condensados ligados a la fibra.	107
3.5.9.4.	Análisis espectrofotómetro de los taninos condensados.	107
3.6.	CÁLCULO DE LOS AAT Y PBV.	108
3.7.	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.	108
4.	RESULTADOS.	115
4.1.	COMPOSICIÓN QUÍMICA.	115
4.1.1.	Orujo de dos fases y hoja de olivo.	115
4.1.2.	Otros ingredientes de las dietas experimentales.	117
4.2.	DIGESTIBILIDAD INTESTINAL DE LA PROTEÍNA NO DEGRADADA EN EL RUMEN.	120
4.3.	CINÉTICA DE DEGRADACIÓN EN EL FERMENTADOR.	122
4.3.1.	Degradabilidad de la materia seca y de la proteína bruta de los distintos ingredientes de las dietas experimentales en los fermentadores de flujo continuo.	122
4.3.2.	Efecto de la adición de PEG sobre la degradabilidad de la materia seca y de la proteína bruta del concentrado (CO) y de la dieta HACO.	128
4.4.	ENSAYOS CON FERMENTADORES DE FLUJO CONTINUO.	130
4.4.1.	Dietas experimentales.	130
4.4.2.	Características de los inóculos ruminales.	130

4.4.3.	Nutrientes suministrados.	133
4.4.4.	Valores de pH de los contenidos de los fermentadores.	136
4.4.5.	Concentración de protozoos en los efluentes y en los contenidos de fermentadores.	140
4.4.6.	Pesos y volúmenes de los efluentes.	141
4.4.7.	Composición de los efluentes.	144
4.4.8.	Producción diaria en los efluentes.	147
4.4.8.1.	Producción de nutrientes y de taninos condensados.	147
4.4.8.2.	Producción de bases púricas.	150
4.4.8.3.	Producción de ácidos grasos volátiles.	152
4.4.8.4.	Producción de nitrógeno total, amoniacal, no amoniacal, del ácido diaminopimélico y de bases púricas.	155
4.4.8.5.	Producción de aminoácidos.	158
4.4.9.	Composición de los extractos bacterianos aislados de los fermentadores.	160
4.4.9.1.	Composición aminoacídica.	160
4.4.9.2.	Composición en bases púricas.	162
4.4.10.	Producción de nitrógeno bacteriano.	165
4.5.	POTENCIAL DE LAS TÉCNICAS DE SIMULACIÓN PARA ESTIMAR LOS RESULTADOS <i>IN VIVO</i> .	168
4.5.1.	Degradabilidad ruminal.	168
4.5.2.	Concentración de amonio.	171
4.5.3.	Concentración de ácidos grasos volátiles.	172
4.5.4.	Producción de nitrógeno bacteriano.	174
4.6.	VALORES DE AAT-PBV.	175
5.	DISCUSIÓN.	179
5.1.	COMPOSICIÓN QUÍMICA.	179
5.2.	DIGESTIBILIDAD INTESTINAL DE LA PROTEÍNA NO DEGRADADA EN EL RUMEN.	182
5.3.	DEGRADABILIDAD DE LA PROTEÍNA EN LOS FERMENTADORES.	184
5.4.	TÉCNICAS DE SIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD RUMINAL: FERMENTADORES DE FLUJO CONTINUO.	188
5.4.1.	Características de los inóculos ruminales utilizados en los fermentadores.	188
5.4.2.	Características de las dietas experimentales administradas a los fermentadores.	190
5.4.3.	pH en los vasos de fermentación.	192
5.4.4.	Los protozoos en los fermentadores.	193
5.4.5.	Características de los efluentes.	194
5.4.5.1.	Ácidos grasos volátiles.	196
5.4.5.2.	Producción de las distintas fracciones nitrogenadas.	199
5.5.	COMPOSICIÓN DE LAS BACTERIAS AISLADAS DE LOS FERMENTADORES.	204
5.6.	PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA BACTERIANA.	207
5.7.	POTENCIAL DE LAS TÉCNICAS DE SIMULACIÓN PARA ESTIMAR LOS RESULTADOS <i>IN VIVO</i> .	210
6.	RESUMEN Y CONCLUSIONES.	215
7.	BIBLIOGRAFÍA.	221

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Composición química (g/100 g MS) del heno de alfalfa.	87
Tabla 2.- Composición en ingredientes (g/kg materia original) de las dietas experimentales suministradas a los fermentadores y a los animales donadores de los inóculos.	89
Tabla 3.- Composición química del orujo de aceituna de dos fases (ODF) y de la hoja de olivo (HO).	116
Tabla 4.- Composición aminoacídica del orujo de dos fases (ODF) y de la hoja de olivo (HO).	117
Tabla 5.- Composición química del heno de alfalfa (HA), del concentrado (CO), de la cebada grano y de las habas.	118
Tabla 6.- Composición aminoacídica del heno de alfalfa (HA) y del concentrado (CO).	119
Tabla 7.- Composición aminoacídica de las habas y de la cebada.	120
Tabla 8.- Degradabilidad ruminal (DRPB, %), digestibilidad intestinal <i>in vitro</i> de la proteína no degradada en rumen (DIPNDR, %) y digestibilidad total (DTPB, %) del orujo de aceituna de dos fases procedente de distintas campañas, de la hoja de olivo desecadas a distintas temperaturas, del concentrado y del heno de alfalfa, tras su incubación en rumen de caprino (c) y de ovino (O) durante 16 o 48 horas.	122
Tabla 9.- Características de la degradación de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) del heno de alfalfa, en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o caprino y alimentados con heno de alfalfa. Efecto de la especie animal.	123
Tabla 10.- Características de la degradación de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) del heno de alfalfa (HA), del concentrado (CO) y de la dieta HACO en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o caprino y alimentados con la dieta HACO. Efecto de la especie animal y del tipo de alimento incubado.	124
Tabla 11.- Características de la degradación de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) del heno de alfalfa (HA), del concentrado (CO) y de la dieta HACO en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o caprino y alimentados con la dieta HACOP. Efecto de la especie animal y del tipo de alimento incubado.	126
Tabla 12.- Características de la degradación de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) de la hoja de olivo obtenidas en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o caprino y alimentados con hoja de olivo. Efecto de la especie animal.	127
Tabla 13.- Características de la degradación de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) de la cebada y de las habas en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o caprino y alimentados con la dieta HOSUP. Efecto de la especie animal y del tipo de alimento incubado.	128
Tabla 14.- Características de la degradación de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) del concentrado (CO) en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o caprino. Efecto de la especie animal y de la adición de PEG.	129
Tabla 15.- Características de la degradación de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) de la dieta HACO en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. Efecto de la especie animal y de la adición de PEG.	130

Tabla 16.- Valores medios del pH y de las concentraciones de N-NH ₃ (mg/100 ml) y ácidos grasos volátiles (mmol/l) del líquido ruminal de ovino o caprino utilizado como inóculo en fermentadores.	132
Tabla 17.- Cantidades de nutrientes y taninos condensados totales suministradas (g/día) a los fermentadores alimentados con distintas dietas experimentales.	132
Tabla 18.- Cantidades de bases púricas suministradas (μmol/día) a los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales.	134
Tabla 19.- Cantidades de aminoácidos suministrados (mg N-aa/día) a los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales.	135
Tabla 20.- Valores medios del pH del contenido de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inóculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.	138
Tabla 20 bis.- Efecto de la especie animal, del tipo de la dieta y de la adición de PEG sobre el pH medio de los contenidos de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inóculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.	139
Tabla 21.- Número de protozoos ruminales (x 10 ⁵ /ml) en los efluentes de fermentadores alimentados con heno de alfalfa e inóculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. Efecto de la especie animal y del tiempo de muestreo.	140
Tabla 22.- Número de protozoos ruminales (x 10 ⁵ /ml) en los contenidos de fermentadores alimentados con heno de alfalfa e inóculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. Efecto de la especie animal y del tiempo de muestreo.	141
Tabla 23.- Pesos (g/día) y volúmenes (ml/día) de los efluentes correspondientes a los ensayos con fermentadores de flujo continuo alimentados con las distintas dietas experimentales e inóculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.	142
Tabla 23 bis.- Efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal, del tipo de dieta suministrada y de la adición de PEG sobre pesos y volúmenes de los efluentes de fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inóculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.	143
Tabla 24.- Contenido en bases púricas (μmol/g MS) de los efluentes obtenidos en los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inóculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.	144
Tabla 25.- Composición (g/100 g MS) de los efluentes obtenidos en los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inóculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.	145
Tabla 26.- Composición en aminoácidos (mg Naa/100 g Nt) de los efluentes obtenidos en los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inóculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.	145
Tabla 27.- Composición en ácidos grasos volátiles (mmol/l) de los efluentes obtenidos en los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inóculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.	146
Tabla 28.- Producción (g/día) de nutrientes y de taninos condensados en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inóculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.	148
Tabla 28 bis.- Efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal, del tipo de dieta suministrada y de la adición de PEG sobre la producción (g/día) de nutrientes y de taninos condensados en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inóculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.	149

- Tabla 29.- Producción de bases púricas ($\mu\text{mol}/\text{día}$) en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. 150
- Tabla 29 bis.- Efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal, del tipo de dieta suministrada y de la adición de PEG sobre la producción de bases púricas ($\mu\text{mol}/\text{día}$) en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. 151
- Tabla 30.- Producción de ácidos grasos volátiles ($\text{mmol}/\text{día}$) y de carbohidratos digestibles totales ($\text{g}/\text{día}$) y eficiencia ($\text{mol AGV}/\text{kg CHOD}$) de la producción de los ácidos grasos volátiles en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. 153
- Tabla 30 bis.- Efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal, del tipo de dieta suministrada y de la adición de PEG sobre la producción de ácidos grasos volátiles ($\text{mmol}/\text{día}$) y de carbohidratos totales digestibles ($\text{g}/\text{día}$) y eficiencia ($\text{mol}/\text{kg CHOD}$) de producción de los AGV en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. 154
- Tabla 31.- Producción media diaria ($\text{mg}/\text{día}$) de nitrógeno total, amoniacal, no amoniacal, del ácido diaminopimélico y de las bases púricas en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. 156
- Tabla 31 bis.- Efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal, del tipo de dieta suministrada y de la adición de PEG sobre la producción media diaria ($\text{mg}/\text{día}$) de nitrógeno total, amoniacal, no amoniacal, del ácido diaminopimélico y de las bases púricas en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. 157
- Tabla 32.- Producción media diaria de aminoácidos ($\text{mg Naa}/\text{día}$) en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. 159
- Tabla 32 bis.- Efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal, del tipo de dieta suministrada y de la adición de PEG sobre la producción media diaria de los aminoácidos ($\text{mg Naa}/\text{día}$) en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. 159
- Tabla 33a.- Composición en aminoácidos ($\text{g Naa}/100 \text{ g N bact}$) de las bacterias aisladas de los efluentes (BE) y de los contenidos de los fermentadores (BAS y BAL) alimentados con heno de alfalfa e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. 160
- Tabla 33b.- Composición en aminoácidos ($\text{g Naa}/100 \text{ g N bact}$) de las bacterias aisladas de los efluentes (BE) y de los contenidos de los fermentadores (BAS y BAL) alimentados con las dietas HACO y HACOP e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. 161
- Tabla 33c.- Composición en aminoácidos ($\text{g Naa}/100 \text{ g N bact}$) de las bacterias aisladas de los efluentes (BE) y de los contenidos de los fermentadores (BAS y BAL) alimentados con las dietas HO y HOSUP e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. 162
- Tabla 34.- Composición en bases púricas ($\mu\text{mol}/\text{g MS}$) y en nitrógeno ($\text{g}/100 \text{ g MS}$) y la relación bases púricas:nitrógeno bacteriano ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) de las bacterias 164

- aisladas en los contenidos de los fermentadores (BAS y BAL) y en los efluentes (BE).
- Tabla 35.- Producción media diaria y eficiencias de producción de nitrógeno bacteriano total y aminoacídico, en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. 166
- Tabla 35 bis.- Efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal, del tipo de dieta suministrada y de la adición de PEG sobre la producción media diaria de las distintas fracciones nitrogenadas bacterianas y sobre las eficiencias de producción en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. 167
- Tabla 36.- Ecuaciones de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de degradabilidad ruminal de la materia seca y de la proteína bruta de los distintos alimentos por separados obtenidos mediante ensayos *in situ* e *in vitro* suministrando las mismas dietas experimentales. Las dos especies (ovina y caprina) juntas. 168
- Tabla 37.- Ecuaciones de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de degradabilidad ruminal de la materia seca y de la proteína bruta de todos los alimentos conjuntos obtenidos mediante ensayos *in situ* e *in vitro* suministrando las mismas dietas experimentales. Diferencias entre caprino y ovino. 169
- Tabla 38.- Ecuaciones de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de degradabilidad ruminal de la materia seca y de la proteína bruta de los alimentos (HA, CO, HACO, cebada y habas) obtenidos mediante ensayos *in situ* e *in vitro* suministrando las dietas (HA, HACO, HACOP y HOSUP). 170
- Tabla 39.- Ecuaciones de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de degradabilidad ruminal de la materia seca y de la proteína bruta de todos los alimentos conjuntamente obtenidos mediante ensayos *in situ* e *in vitro* suministrando las mismas dietas experimentales. 171
- Tabla 40.- Ecuaciones de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de la concentración amoniacal obtenidos mediante ensayos *in vivo* y en los fermentadores suministrando las distintas dietas experimentales (HA, HACO, HACOP, HO y HOSUP). Diferencias entre ovino y caprino. 171
- Tabla 41.- Ecuaciones de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de la concentración amoniacal obtenidos mediante ensayos *in vivo* y en los fermentadores suministrando las dietas experimentales (HA, HACO, HACOP y HOSUP). 172
- Tabla 42.- Ecuaciones de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de la concentración amoniacal obtenidos mediante ensayos *in vivo* y en los fermentadores suministrando las distintas dietas experimentales. 172
- Tabla 43.- Ecuaciones de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de la concentración de AGV totales obtenidos mediante ensayos *in vivo* y en fermentadores suministrando las distintas dietas experimentales. Diferencias entre ovino y caprino. 173
- Tabla 44.- Ecuación de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de la concentración de AGV totales obtenidos mediante ensayos *in vivo* y en los fermentadores suministrando con las dietas experimentales (HA, HACO, HACOP y HOSUP). 173
- Tabla 45.- Ecuación de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de la concentración de AGV totales obtenidos mediante ensayos *in vivo* y en fermentadores suministrando la dieta experimental HO. 173
- Tabla 46.- Ecuación de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre las concentraciones de AGV 174

- totales obtenidos mediante ensayos *in vivo* y en fermentadores suministrando las distintas dietas experimentales.
- Tabla 47.- Estimación de la producción de AGV totales *in vivo*, utilizando las producciones de AGV *in vitro*. 174
- Tabla 48.- Ecuación de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre la producción de nitrógeno bacteriano obtenida en caprino y en los fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino alimentados con las distintas dietas experimentales. 175
- Tabla 49.- Ecuación de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre la producción de nitrógeno bacteriano obtenida mediante ensayos *in vivo* y en fermentadores suministrando las distintas dietas experimentales. 175
- Tabla 50.- Valores medios de aminoácidos verdaderamente absorbidos en el intestino delgado (AAT) y del balance proteico en el rumen (PBV) que promueve la ingestión de las distintas dietas experimentales en ovino y caprino. 176

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Esquema del proceso de extracción del aceite de oliva por centrifugación en dos fases.	84
Figura 2.- Esquema general del desarrollo de los ensayos.	93
Figura 3.- Esquema de aislamiento de bacterias de efluentes.	110
Figura 4.- Esquema de aislamiento de bacterias de los contenidos de los fermentadores.	111
Figura 5.- Evolución del pH del contenido de los fermentadores durante los ensayos.	137

LISTADO DE ABREVIATURAS.

<i>a</i>	Fracción rápidamente degradable en el rumen o en el fermentador
AA = aa	Aminoácido(s)
AAD	Alfa aminoadípico
AAE	Aminoácidos esenciales
AA NE	Aminoácidos no esenciales
AAT	Aminoácidos absorbidos en el intestino delgado
AAT/PBV	Sistema Escandinavo de Valoración Proteica de Alimentos para Rumiantes
AATOT	Aminoácidos totales
Ad	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEPA	Ácido aminoetilfosfónico
AFRC	Agricultural Food and Research Council
AGVs	Ácidos grasos volátiles totales
Al	Alopurinol
Ala	Alanina
ARC	Agricultural Research Council
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ARN/N	Proporción entre ácido ribonucleico y nitrógeno
Asp	Ácido aspártico
<i>b</i>	Fracción potencialmente degradable en el rumen o fermentador
BAL	Bacterias asociadas a la fase líquida
BAS	Bacterias asociadas a la fase sólida
BE	Bacterias de los efluentes
BP	Bases púricas
BP:N	Proporción entre bases púricas y nitrógeno
<i>c</i>	Velocidad de degradación de la fracción b en el rumen o fermentador
C	Caprino
C2	Ácido Acético
C2/C3	Proporción entre ácido acético y propiónico
C3	Ácido propiónico
C4	Ácido butírico
C5	Ácido valérico
C6	Ácido caproico
Cap	caprino
CD	Coefficiente de determinación
Cel	Celulosa
CHO	Carbohidratos totales
CHOD	Carbohidratos totales digeridos
Cis	Cisteína
CO	Concentrado
CR	Coefficiente de respuesta
DAPA	Ácido diaminopimélico
DAPA:N	Proporción entre ácido diaminopimélico y nitrógeno
DE	Degradabilidad efectiva
DIPNDR	Digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen
DMS	Degradabilidad de la materia seca
DP	Degradabilidad potencial en rumen o fermentador
DPB	Degradabilidad de la proteína bruta

DRPB	Degradabilidad ruminal de la proteína bruta
DTPB	Degradabilidad total de la proteína bruta
E	Efecto estadístico de la especie animal
EB	Energía bruta
EE	Extracto etéreo
EEM	Error estándar de las medias
ExA	Interacción entre la especie animal y el alimento
ExD	Interacción especie animal donadora del inoculo ruminal x tipo de dieta
ExP	Interacción especie animal donadora del inoculo ruminal x adición de PEG
FAD	Fibra ácido detergente
Fen	Fenilalanina
FND	Fibra neutro detergente
Gli	Glicina
Glu	Ácido glutámico
Gn	Guanina
HA	Heno de alfalfa
HACO	Heno de alfalfa y concentrado
HACOP	Heno de alfalfa, concentrado y PEG
HC	Hemicelulosa
His	Histidina
HO	Hoja de olivo
HOSUP	Hoja de olivo, cebada y habas
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IC4	Ácido butírico
IC5	Ácido valérico
Ile	Isoleucina
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
<i>k</i>	Velocidad de paso de la digesta en rumen o en fermentador
LAD	Lignina ácido detergente
Leu	Leucina
Met	Metionina
MF	Materia fresca
min	Minutos
MMV	Mezcla minero-vitamínica
MO	Materia orgánica
MS	Materia seca
n	Número de repeticiones
N Bact	Nitrógeno bacteriano
N BAS	Nitrógeno de las bacterias asociadas a la fase sólida
Naa Bact	Nitrógeno aminoácido bacteriano
Naa=N-aa	Nitrógeno aminoácido
N-BP	Nitrógeno púrico
N-DAPA	Nitrógeno diaminopimélico
N-FAD	Nitrógeno asociado a la fibra ácido detergente
NKJ	Sistema Escandinavo de Valoración Proteica de Alimentos para Rumiantes
NNA	Nitrógeno no amoniacal
N-NH ₃	Nitrógeno amoniacal
NS	No significativo
Nt	Nitrógeno total
ODF	Orujo de dos fases
Ovi	Ovino

P	Nivel de significación
p/v	Proporción entre peso y volumen
PA	Pronantocianidina
PB	Proteína bruta
PBV	Balance proteico en el rumen
PDNDR	Proteína digestible no degradada en el rumen
PEG	Polietilen glicol
PITC	fenilisotiocianato
PM	Proteína microbiana
Pro	Prolina
PVP	Polivinilpirrolidona
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
r	Coefficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto
RSD	Desviación estándar residual
SD	Significación del efecto del tipo de dieta
Ser	Serina
SP	Significación de la adición de PEG
TC	Taninos condensados
TCF	Taninos condensados ligados a la fibra
TCL	Taninos condensados libres
TCP	Taninos condensados ligados a la proteína
TCT	Taninos condensados totales
TEA	Trietilamina
TH	Taninos hidrolizables
Tir	Tirosina
Tre	Treonina
Val	Valina

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

El olivo (*Olea europaea*) es uno de los árboles más antiguos que ha cultivado el hombre, antes incluso del comienzo de la historia escrita (FIORINO et al., 1992).

En la actualidad, España es el país en el que más olivos se cultivan (más de 300 millones) y también el primer país productor de aceite de oliva (1.214.000 Tm en la campaña, 2002/03, MAPA, 2003). Andalucía, con el 60% de la superficie olivarera española, aglutina el 85% de la producción nacional (932.715 Tm en el año 2002/03, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, 2003). El papel del olivar en esta región es muy importante desde el punto de vista económico, social y también medioambiental.

Sin embargo, el sector olivarero genera anualmente grandes cantidades de subproductos derivados, tanto de la extracción del aceite de oliva como de la limpieza de la aceituna en la almazara. En el proceso de limpieza de la aceituna en almazara se generan grandes cantidades de hojas y de pequeños cogollos que representan entre 3 y 5% del total de la aceituna procesada (DELGADO PERTÍÑEZ, 1994) para la extracción del aceite de oliva.

El uso de una nueva tecnología de extracción del aceite de oliva, llamada de "dos fases" representa una serie de ventajas respecto a la tradicional de "tres fases", pero genera grandes cantidades de un nuevo subproducto llamado "orujo de dos fases". El acúmulo de dicho subproducto provoca graves problemas medioambientales y económicos, por lo que sería conveniente adoptar nuevos criterios en su aprovechamiento.

En este contexto el uso adecuado de los subproductos del olivar (orujo de dos fases y hoja de olivo) como fuentes de alimento para el ganado podría contribuir a paliar la deficiencia en pastos que caracteriza a la Cuenca Mediterránea.

El estudio del valor nutritivo de estos subproductos en el marco de los Nuevos Sistemas de Valoración Proteica de Alimentos para Rumiantes se ve limitado por la necesidad de adaptar las técnicas disponibles a este tipo de materiales. Estos sistemas requieren la determinación precisa de la disponibilidad de la proteína de un alimento a través del conocimiento de la síntesis de proteína microbiana que tiene lugar en el rumen y de la digestibilidad, en intestino, de la proteína no degradada en rumen. Así, el uso de metodologías de simulación de la actividad ruminal e intestinal podría representar una alternativa a los estudios *in vivo*, por la posibilidad que ofrecen en lo que respecta a la cuantificación de los productos de la fermentación ruminal, especialmente en lo referido a la síntesis de proteína microbiana. La determinación de este parámetro es de extraordinaria

importancia ya que, en condiciones normales de alimentación, la proteína microbiana que se sintetiza en el rumen representa alrededor del 70% de la proteína total que el animal tiene disponible para atender a sus necesidades de mantenimiento y producción. Sin embargo, su cuantificación *in vivo* es difícil desde el punto de vista metodológico. En este sentido, es necesario validar las metodologías de simulación para la valoración de alimentos de carácter lignocelulósico y encontrar un marcador microbiano adecuado.

Por otro lado, la ventaja metodológica que las técnicas de simulación representan para la cuantificación de la digesta ruminal total pueden permitir conocer el efecto del tipo de dieta y de metodología empleada para obtener una muestra representativa de la microbiota ruminal sobre la composición de distintas fracciones de microorganismos ruminales, puesto que esta cuestión no está resuelta en la actualidad (CARRO y MILLER, 2002; RANILLA y CARRO, 2003).

Otro de los inconvenientes que los estudios *in vivo* presentan es el número de animales que se precisan y que una gran parte de ellos hayan de ser intervenidos quirúrgicamente, lo que se complica aún más cuando se abordan estudios comparativos entre caprino y ovino. Aún así, la información comparada en este sentido es necesaria para poder racionar de forma adecuada dietas para ambas especies animales con alimentos desequilibrados y que esas dietas sean capaces de atender adecuadamente sus necesidades específicas sin derroche de nutrientes. Así, las técnicas de simulación podrían representar una alternativa válida.

Otro aspecto no suficientemente aclarado en la actividad es el que se refiere al marcador más adecuado para llevar a cabo la cuantificación de la proteína sintetizada en el rumen. Un marcador frecuentemente utilizado, tanto en ensayos *in vivo* como en ensayos mediante técnicas de simulación (fermentadores) es el ácido diaminopimélico (DAPA), marcador específico de las paredes bacterianas. Recientemente, es frecuente el uso de las bases púricas como marcadores microbianos, sobre todo en ensayos *in vivo* ya que es posible estimar la cantidad de proteína microbiana ruminal a partir de las cantidades de derivados de estas bases que se excretan en orina y, por tanto, evitar el uso de animales canulados. Un estudio comparativo de esos dos marcadores: DAPA y bases púricas, en un ambiente controlado como es el caso de los sistemas de simulación, puede contribuir a aclarar muchos aspectos importantes en este sentido.

Por último, estudios realizados previamente en nuestro grupo (MARTÍN GARCÍA, 2001; YÁÑEZ RUIZ, 2003) apuntan a un efecto de la presencia de factores no nutritivos en el orujo de dos fases, pero no en la hoja de limpia. Este hecho ha de verificarse sobre los parámetros antes referidos y dicha verificación ha de ser también cuantitativa. Así, el uso de

agentes , como el polietilen glicol (PEG), que se acomplejen con esos factores evitando su acción, representa una vía adecuada para su estudio (SILANIKOVE *et al.* 1996b, MARTÍN GARCÍA, 2001).

Por todo lo expuesto anteriormente, los objetivos planteados en este trabajo de Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Determinar la disponibilidad, en rumen y en intestino delgado, del orujo de aceituna de dos fases y de la hoja de olivo de “limpia” y caracterizar, mediante el uso de técnicas de simulación, cualitativa y cuantitativamente los productos derivados de la fermentación de dietas prácticas que incluyen estos subproductos.
2. Estudiar, comparativamente, las posibilidades de dos marcadores microbianos, el ácido diaminopimélico y las bases púricas para estimar la cantidad de proteína microbiana producida en el rumen.
3. Estudiar la composición de la proteína de diferentes fracciones bacterianas y compararlas en cuanto a su adecuación como muestras representativas para la cuantificación de la proteína microbiana total que se produce en el rumen.
4. Realizar un estudio comparativo ovino-caprino y conocer el efecto del tratamiento con PEG de las dietas que incluyen orujo sobre todos los parámetros considerados.
5. Establecer la potencialidad de las técnicas de simulación para estimar la fermentación ruminal *in vivo* de dietas en ovino y caprino que incluyen orujo de dos fases y hoja de olivo de limpia.

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or title.

Main body of faint, illegible text, appearing to be several paragraphs of a document.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. LOS SUBPRODUCTOS DE LA AGROINDUSTRIA OLIVARERA Y SU IMPORTANCIA EN LA NUTRICIÓN DE RUMIANTES.

2.1.1. Breve introducción histórica sobre el olivo.

El olivo (*Olea europaea*) pertenece a la familia Oleaceae y es la única especie con fruto comestible de esta familia. Se considera uno de los primeros árboles que ha cultivado el hombre. Ya se cultivaba antes incluso del comienzo de la historia escrita (FIORINO *et al.*, 1992).

La rama del olivo ha simbolizado la amistad y la paz entre las naciones. La mitología griega, el Antiguo Testamento y el Corán están llenos de citas referentes al papel del olivo en la religión y en la vida diaria de los países en que se cultiva. Entre los mitos relacionados con el olivo, los más simbólicos son el origen de la ciudad de Atenas y el vuelo de la paloma portando un rama de olivo sobre el Arca de Noé.

Los primeros documentos escritos sobre el aceite de oliva son las tabillas minoicas, que constituyen el mayor testimonio arqueológico de la importancia de ese aceite, en la corte del rey Minos, para la economía cretense 2500 años a. de J.C.

El origen del olivo es controvertido (LOUKAS y KRIMBAS, 1983). Ciertos historiadores indican que el olivo procede de Persia; otros sitúan su origen en el valle del Nilo y hay quienes indican que el olivo es originario del valle del Jordán. Sin embargo, mayoritariamente se considera que este árbol ya crecía en el antiguo Irán y en Mesopotamia hace cinco mil años (ANON., 1983; LOUKAS y KRIMBAS, 1983; FIORINO *et al.*, 1992), lugar desde el cual se expandió al resto de los países. Probablemente, el olivo fue introducido en la Península Ibérica por los romanos y árabes alrededor del siglo VI a.C. (KIRITSAKIS, 1992). Los árabes introdujeron sus variedades en el sur de España, especialmente en el valle del Guadalquivir e influyeron en la difusión de su cultivo hasta el punto de que los vocablos castellanos "aceituna" o "aceite" tienen raíz árabe. El término "aceite" proviene del árabe "az-zait" que significa "jugo de aceituna".

En la actualidad, España es el país en el que más olivos se cultivan (más de 300 millones) seguido, a gran distancia, por Grecia e Italia y un poco más atrás se sitúan Túnez, Turquía, Siria y Marruecos. Según los datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en el año 1992, la superficie olivarera total en España era de 2.141.100 Ha, lo que supone cerca del 10% de la superficie agrícola nacional y el 24% de la superficie

olivarera mundial. Fundamentalmente, el olivar cultivado en España se dedica a la producción de aceite y, solamente 190.000 Ha a la producción de aceituna de mesa (CIVANTOS, 1995).

España es el primer país en el ranking de producción mundial de aceite de oliva, con una producción media anual de 700.000 a 800.000 toneladas, llegando a alcanzar 1.000.000 en las campañas más recientes y, a superarlas ampliamente en algunas campañas, como en el caso de la del 2001-2002, en que se ha alcanzado una producción de 1.300.000 toneladas. También es el primer país exportador mundial (web del olivar OLIVIUM). Marruecos produjo un total de 52.500 toneladas de aceite (2% de la producción mundial) en las campañas 1997/98-2000/01 (OLIVAE, 2002).

Andalucía, con el 60% de la superficie olivarera española, aglutina el 85% de la producción nacional (1.085.501 Tm en el año 2002) (MAPA, 2002).

La importancia del sector oleícola en España, desde el punto de vista social, es notable, si se tiene en cuenta que son necesarias alrededor de 25 millones de jornadas de trabajo en una campaña oleícola, cuyo valor es del orden de 600 millones de euros (CIVANTOS, 1995). Aparte de cumplir una función económica y social importante en la región, el olivo cumple también una importante función medioambiental ya que es un árbol que se adapta a condiciones de sequía; su cultivo es posible en suelos marginales y evita las pérdidas de suelo por erosión.

El cultivo del olivo no obstante, y la extracción del aceite de oliva generan grandes cantidades de subproductos.

2.1.2. Hoja de olivo.

Las hojas y las ramas de olivo son subproductos que provienen, fundamentalmente, de la poda de los árboles pero también de la limpieza de la aceituna en las almazaras.

El sistema de recogida de aceituna, mediante vareo del olivo, proporciona una cantidad importante de hojas y pequeños cogollos que se mezclan con el fruto. En las almazaras, se procede a la retirada de dichas hojas que quedan como un residuo de dichas industrias en una proporción que varía entre 3 y 5% del total de aceituna procesada (DELGADO PERTÍÑEZ, 1994) para la extracción del aceite.

Es preciso distinguir entre la hoja recogida en almazara, en la que la parte de leño es insignificante, y el ramón, en el que el leño puede ser importante. Según CIVANTOS (1981) la proporción de hojas en el ramón, con diámetro inferior a 4 cm, es de un 50% aproximadamente.

En la Cuenca Mediterránea, la hoja y el ramón se utilizan tradicionalmente en alimentación animal (fundamentalmente de rumiantes) y pueden constituir un recurso forrajero apreciable, sobre todo en periodos de sequía. Sin embargo, su conservación es un problema importante. Al problema de la conservación, se puede añadir el inconveniente de que la hoja suele estar contaminada con tierra (2 – 10%, VERA, 1990).

En términos generales, estos subproductos tienen características relativamente homogéneas en relación a su composición química (PARELLADA *et al.*, 1984; SANSOUCY *et al.*, 1985; NEFZAOUY y ZIDANI, 1987).

El valor nutritivo de la hoja y del ramón de olivo, en estado fresco, se considera similar al de los forrajes de mediana calidad. En general, los valores de digestibilidad encontrados son variables en función de factores como la especie animal que la consume (GÓMEZ CABRERA *et al.*, 1982; MUÑOZ *et al.*, 1983b; MARTÍN GARCÍA, 2001), la proporción de leño presente en la hoja, el método de conservación (MAYMONE *et al.*, 1950; BOZA y GUERRERO, 1981; GÓMEZ CABRERA *et al.*, 1992), la variedad de olivo, la época de recogida y la variación interanual.

La digestibilidad de la proteína bruta oscila entre 30 y 40% en el caso de las hojas frescas (GÓMEZ CABRERA *et al.*, 1992). Esta digestibilidad tiende a disminuir con la desecación y puede llegar a ser nula (ALIBÉS *et al.*, 1982). Esta baja digestibilidad de la proteína bruta podría deberse a la gran proporción del nitrógeno ligado a las paredes celulares (superior al 50%, MARTÍN GARCÍA, 2001) o a la presencia de compuestos fenólicos de diferente naturaleza (DELGADO PERTÍÑEZ *et al.*, 1998; MARTÍN GARCÍA, 2001; MOLINA ALCAIDE *et al.*, 2003, en prensa) que podrían actuar como agentes inhibidores del proceso digestivo.

Con objeto de mejorar el valor nutritivo de las hojas de olivo, se han realizado diversos tratamientos: separación del leño, adición de álcalis (ALIBÉS *et al.*, 1982; MARTILOTY y DANESSE, 1983) etc, sin que los efectos obtenidos sean realmente importantes.

MARTÍN GARCÍA (2001), con fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o caprino, obtuvo una mejora en la disponibilidad de la proteína bruta, de los componentes fibrosos y del nitrógeno ligado a las paredes celulares cuando la hoja de olivo se suplementó con nitrógeno (proteico o no proteico). Este autor obtuvo también un aumento en la producción de aminoácidos y de nitrógeno bacteriano como consecuencia de la suplementación nitrogenada.

En Túnez, NEFZAOUY y ZIDANI (1987), al comparar este subproducto con el heno de veza-avena, encontraron un valor nutritivo similar.

En general, la utilización de estos subproductos en fresco puede hacerse de forma similar a la de los forrajes pobres y de mediana calidad. Su valor nutritivo puede mejorarse mediante un aporte limitado de energía y proteína complementarios (ALIBÉS *et al.*, 1982).

Los trabajos que se han llevado a cabo en relación a la alimentación animal, con este subproducto coinciden en una observación: el bajo valor proteico de la hoja de olivo. Sin embargo, no se han estudiado en profundidad las causas de este bajo valor proteico. Tampoco se han estudiado en profundidad los procesos de síntesis de proteína microbiana y de degradación de la proteína en el rumen así como las diferencias entre ovino y caprino, en cuanto a la capacidad relativa de ambas especies animales, para responder ante la presencia de los compuestos fenólicos de la hoja en su dieta.

Los estudios acerca de la cantidad y la naturaleza de los compuestos fenólicos presentes en la hoja de olivo son escasos y contradictorios (DELGADO PERTÍÑEZ, 1994; FEGEROS *et al.*, 1995; DELGADO PERTÍÑEZ *et al.*, 1998; MARTÍN GARCÍA, 2001; YÁÑEZ RUIZ, 2003). Probablemente este tipo de información, junto con la derivada de estudios que permitan conocer el efecto de la suplementación energético-proteica de estas hojas conduciría a un uso más eficaz de este subproducto, en la alimentación del ganado, en las zonas áridas o semiáridas de la Cuenca Mediterránea.

2.1.3. Orujo de aceituna.

La sustitución de las prensas hidráulicas en el proceso de obtención del aceite de oliva por el sistema de centrifugación en tres fases implicaba la obtención de aceite, orujo y alpechín. Este sistema tenía un inconveniente ya que, para dar fluidez al proceso de centrifugación, era necesario añadir un litro de agua por cada kg de aceituna procesada, con lo que la cantidad de residuos aumentaba y se ocasionaba un problema ambiental importante, al que se sumaba la escasa disponibilidad de agua en épocas de la sequía.

A principios de los años 90 surgieron las nuevas tecnologías de “dos fases” como una alternativa más ecológica que las de “tres fases”. Este proceso requiere la utilización de una menor cantidad de agua y permite la separación de líquido y sólido en 2 fases independientes: aceite y orujo + alpechín, mezcla a la que se denomina “alperujo”. Este se traslada a las orujeras extractoras para su procesado y obtención del aceite de orujo. Este orujo extractado es, además, desecado en el mismo proceso y, posteriormente, se separan parte de los huesos triturados, mediante ventilación forzada. El subproducto resultante se denomina “orujo de dos fases extractado, desecado y parcialmente deshuesado”.

El acúmulo de estos nuevos subproductos representa graves problemas medioambientales, económicos y sociales para las extractoras y las orujeras, por lo que sería conveniente adoptar nuevos criterios en su aprovechamiento.

La mayoría de los trabajos realizados en nutrición animal han empleado los subproductos de "tres fases" (MAYMONE *et al.*, 1961; BEN DHIA *et al.*, 1981; NEFZAOU, 1985). Los datos existentes sobre la digestibilidad de los orujos de tres fases son escasos y muy variables. Todos indican una baja digestibilidad, especialmente de la proteína (BOZA y VARELA 1960; BOZA *et al.*, 1970; THERIEZ y BOULE, 1970; BEN DHIA, 1981; NEFZAOU, 1985; AGUILERA y MOLINA, 1986; MOLINA y AGUILERA, 1988). Los orujos de aceituna son particularmente ricos en lignina y pobres en contenidos celulares. Se produce un fenómeno de protección de los carbohidratos vinculados a la lignina y una gran parte del nitrógeno está ligado a la FAD, lo que podría explicar la baja solubilidad y digestibilidad del nitrógeno. En los orujos tratados con álcalis, la digestibilidad *in vitro* se cuadruplica (NEFZAOU, 1983).

Las reacciones de Maillard, favorecidas por las condiciones de temperatura y humedad que se producen durante la extracción del aceite y el secado de los orujos, son en gran parte, responsables del deterioro de la calidad de su proteína. También el contenido en polifenoles, de tipo tanino, podría explicar la baja disponibilidad del nitrógeno en los orujos.

Los orujos de aceituna, en sus distintas formas, se utilizan tradicionalmente como alimento para rumiantes, en la mayor parte de los países productores de aceite de oliva, aunque hayan sido escasos los estudios que se han llevado a cabo sobre el efecto que tendría su inclusión sobre el valor nutritivo de dietas con diferentes grados de incorporación del subproducto (AGUILERA *et al.*, 1992) y, casi nulos los relativos al efecto de la incorporación de orujos de "dos fases".

Los orujos de "dos fases" pueden constituir una fuente de alimento de gran interés para rumiantes, sobre todo si se aprovecha como ingrediente de concentrados y se estudia su efecto sobre la dieta.

2.2. MICROORGANISMOS RUMINALES.

El rumen es habitado por una población microbiana compleja y diversa que incluye bacterias, protozoos y hongos (ORPIN y JOBLIN, 1989; STEWART y BRYANT, 1989; WILLIAMS y COLEMAN, 1989). La mayor parte de estos microorganismos son anaerobios y capaces de degradar polímeros de la pared celular de las plantas: celulosa, hemicelulosa,

pectina y contenidos celulares, transformándolos en AGV y amonio, utilizables por el animal (HOBSON y WALLACE, 1982a), y en metano. La composición de la dieta del animal y su forma física afectan a la población ruminal (THORLEY *et al.*, 1968; EADIE y MANN, 1970; ALLISON *et al.*, 1975; MACKIE *et al.*, 1978).

Bacterias: Constituyen el grupo más numeroso (10^{11} células/ml de contenido ruminal; HUNGATE, 1966; HOBSON y WALLACE, 1982a) y el más importante, dado su papel en la degradación de las plantas. Las características de este grupo dependen de factores tales como el tipo de dieta (HUNGATE, 1966; MANN y ØRSKOV, 1975; HORTON *et al.*, 1980; JOUANY, 1994; MANSFIELD *et al.*, 1994; WEISS, 1994; MOLINA *et al.*, 1996; MCSWEENEY *et al.*, 2001; ODENYO *et al.*, 2001), nivel de alimentación (GALINDO *et al.*, 1985) y el momento y frecuencia de la alimentación (WARNER, 1966; DEHORITY y ORPIN, 1988). Las principales bacterias implicadas en la degradación de celulosa son *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Eubacterium cellulosolvens* (SIJPESTEIJN, 1951; BRYANT *et al.*, 1958; HUNGATE, 1966; GALINDO *et al.*, 1991). La hemicelulosa también es degradada por algunas bacterias celulolíticas, junto a las bacterias que degradan las hemicelulosas, tales como *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Bacteroides ruminicola* (HUNGATE, 1966; DEHORITY y SCOTT, 1967). Las bacterias pectinolíticas predominantes en el rumen son *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Lachnospira multiparus* (WOJCIECHOWICZ *et al.*, 1982; WILLIAMS, 1986). Las principales bacterias amilolíticas, en el rumen, son *Bacteroides amylophilus*, *Selonomonas ruminantium* y *Streptococcus bovis*. Estos microorganismos ocupan distintos nichos ecológicos en el rumen, compiten con otros microorganismos por sustratos fácilmente degradables y sobreviven gracias a su rápida velocidad de crecimiento (HOBSON, 1971; LIN *et al.*, 1985). La proteína que entra en el rumen es rápidamente degradada a amonio, siendo la mayoría de las bacterias ruminales, con la excepción de las principales bacterias celulolíticas, proteolíticas. Las principales especies proteolíticas en el rumen son *Bacteroides amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Bacteroides ruminicola* (HOBSON y WALLACE, 1982; WALLACE, 1991). Casi todas las especies de bacterias y hongos y algunos protozoos pueden utilizar el amonio como precursor para la síntesis de sus componentes nitrogenados celulares (BRYANT y ROBINSON, 1962; WOLIN, 1979).

Protozoos: Son los microorganismos de mayor tamaño en el rumen; su concentración oscila entre 10^5 y 10^6 por ml de líquido ruminal (THEODOROU y FRANCE, 1993); son de gran tamaño (5 a 250 μm de longitud; HUNGATE, 1966; WILLIAMS y COLEMAN, 1988). Su contribución a la masa microbiana ruminal puede llegar a ser hasta del 40% (BOHATIER, 1991) que sobrepasa su importancia metabólica (VAN SOEST, 1994). La mayoría de los

protozoos ruminales son ciliados pero existen también algunos flagelados. Los dos principales grupos de ciliados son los Entodiniomorfos y los Holotricos y ninguno de ellos se mantiene en cultivos *in vitro* (THEODOROU y FRANCE, 1993). Los protozoos son capaces de degradar los principales constituyentes de las plantas. Los Holotricos (géneros *Dasytricha* e *Isotricha*) pueden suplir sus requerimientos energéticos a partir de azúcares solubles o a través de la producción de celulasa, para degradar los polímeros de las plantas (HOBSON y WALLACE, 1982). Los Entodiniomorfos (género *Epidinium*) pueden fragmentar la biomasa de las plantas y, más tarde, digerirla. El papel de los protozoos en el rumen no es claro, debido a las limitaciones que implican las dificultades para su cultivo *in vitro*.

Hongos: Son microorganismos flagelados que poseen zoosporas móviles (ORPIN, 1975, 1976, 1977a; BAUCHOP, 1979). Colonizan regiones dañadas de los tejidos vegetales en las 2 horas siguientes a la ingestión de alimento, en respuesta a la presencia de materiales solubles. Su densidad es de 10^3 - 10^5 por ml de fluido ruminal (THEODOROU y FRANCE, 1993). Se han identificado especies de 4 géneros diferentes: *Neocallimastix*, *Caecomyces* (formalmente *Sphaeromona*), *Pyromyces* (formalmente *Phyromonas*) y *Orpinomyces* (VAN SOEST, 1994). Son abundantes en dietas ricas en materiales fibrosos de plantas (FONTY y JOBLIN, 1991). Parecen tener enzimas que podrían permitir la degradación total de los carbohidratos estructurales disponibles en paredes celulares vegetales (ORPIN y LETCHER, 1979; ORPIN, 1981). El papel de los hongos en el rumen es menos claro (BAUCHOP, 1979) cuando los animales toman dietas altamente fibrosas. Los hongos representan aproximadamente 8% de la masa microbiana (ORPIN, 1984; CITRON *et al.*, 1987) pero su número es mucho menor cuando los animales se alimentan con dietas ricas en concentrado (FONTY *et al.*, 1987).

2.3. COMPUESTOS FENÓLICOS. EFECTOS SOBRE LA MICROBIOTA RUMINAL.

Los compuestos fenólicos están incluidos en un grupo, presente en las plantas, denominado "compuestos secundarios" y que engloba sustancias químicamente muy diversas. Este término se establece como contraposición a los productos del metabolismo primario, que aparecen en el citoplasma de todas las células vegetales. Muchos compuestos secundarios son empleados por la planta con distintas funciones. Así, intervienen en relaciones de competencia con otras plantas, actuando como agentes alelopáticos y contra invasiones de hongos, bacterias y virus (HARBORNE, 1993); en relaciones de mutualismo: atracción de los polinizadores y dispersores de semillas (RHOADES, 1979); como moléculas portadoras de información relacionada con posibles funciones defensivas (STAFFORD,

1988); como factores de protección contra la radiación ultravioleta y desecación, como reserva de nitrógeno (RHOADES, 1979; POULTON, 1990) etc. Debido al elevado coste energético que implica su síntesis, las plantas enfocan su metabolismo hacia un tipo u otro de estos compuestos secundarios dependiendo de los recursos disponibles (BRYANT *et al.*, 1992).

SEGUIN (1796) fue el primero en utilizar la palabra "taninos" para describir la sustancia que producía el encurtido del cuero (HASLAM, 1981). La palabra tanino deriva del latín "tan(n)are" que significa sostener o ligar.

Los estudios acerca de las asociaciones reversibles de polifenoles con proteínas tienen una larga historia. Sir Humphry Davy, en 1803, fue uno de los primeros científicos en publicar un trabajo en este tema (SPENCER *et al.*, 1988). Este trabajo demostró algunos de los aspectos macroscópicos relativos a la formación de complejos entre polifenoles y proteínas y dio lugar a diversas definiciones del término "taninos vegetales" (WHITE, 1957).

En una revisión realizada por HASLAM (1981) sobre los taninos vegetales, se comentan las contribuciones hechas al conocimiento de las bases químicas de los taninos al principio del siglo pasado, pero también se resalta que hasta 1950 se hicieron pocos progresos reales para entender la complejidad de la estructura y la química de los taninos. HASLAM (1981) ha llamado a este fenómeno una de las "esquinas desordenadas de la química orgánica". A mediados de los años 50, la investigación sobre la química y la estructura de la lignina fomentó un renovado interés sobre los taninos vegetales (HERGET, 1989).

PORTER, en 1988, informó de los avances producidos en la química de los polifenoles, particularmente en el conocimiento de las proantocianidinas.

Los taninos son sustancias no bien definidas químicamente pero que tienen algunas propiedades comunes. Incluyen una pequeña parte del amplio y diverso grupo de los compuestos fenólicos de 7 a 9 átomos de carbono, tales como los ácidos gálico y p-cumárico, los flavanos de 15 átomos de carbono, los cuales tienen un alto grado de polimerización (WONG, 1973). Los taninos se clasifican normalmente en taninos hidrolizables (TH) y taninos condensados (TC) (MCLEOD, 1974; HASLAM, 1981; MANGAN, 1988; HEMINGWAY, 1989) aunque ambos tipos pueden sufrir procesos hidrolíticos en medio acuoso (MOLE y WATERMAN, 1987). Un tercer tipo de taninos podría corresponder al florotanino que se ha aislado de algas pertenecientes a diversos géneros (GLOMBITZA y GESTBERGER, 1985; PORTER, 1989). Los taninos hidrolizables están constituidos por un núcleo compuesto por un glúcido, cuyos grupos hidroxilos se encuentran esterificados con ácidos carboxílicos fenólicos. Su distribución está limitada en la naturaleza (MCLEOD, 1974;

HASLAM, 1981; MANGAN, 1988) pero son abundantes en las hojas, frutos, ramas y agallas de algunas plantas dicotiledoneas. El peso molecular de los TH oscila entre 500 y 3000 (MCLEOD, 1974; HASLAM *et al.*, 1977; MURDIATI y MCSWEENEY, 1987; LEWIS y YAMOMOTO, 1989; DOIG *et al.*, 1990). Los taninos condensados (leucoantocianinas o leucoantocianidinas), recientemente llamados proantocianidinas, son polímeros no ramificados de hidroxiflavonoles (flavan 3,4-diol, como el monómero leucoantocianidina y flavan 3-ol, como catequina; WRONG, 1973; MCLEOD, 1974; DESHPANDE *et al.*, 1986; MOLE y WATERMAN, 1987; STAFFORD, 1988; HAGERMAN y BUTLER, 1991; MUELLER-HARVEY y MCALLAN, 1992; REED, 1995; SCHOFIELD *et al.*, 2001). El peso molecular de los TC oscila entre 1000 y 20000 (MCLEOD, 1974; HASLAM, 1975; MANGAN, 1988; LEWIS y YAMAMMOTO, 1989; PORTER, 1989) y son muy abundantes en el reino vegetal. Tanto unos como otros son insolubles en solventes no polares (éter, cloroformo, benceno) y solubles en agua y alcohol (DESHPANDE *et al.*, 1986; MOLE y WATERMAN, 1987; HAGERMAN y BUTLER, 1991).

2.3.1. Interacción de los taninos con proteínas y carbohidratos.

La gran cantidad de grupos hidroxilo fenólicos que poseen los taninos les hace muy reactivos, proporcionándoles numerosos puntos de anclaje, susceptibles de formar puentes de hidrógeno. Por ello, forman asociaciones reversibles con otras moléculas, mostrando mayor afinidad por las proteínas debido a la fuerte tendencia a formar puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los taninos y el oxígeno del grupo carbonilo de los péptidos (MCLEOD, 1974). Se ha comprobado que los complejos tanino-proteína se forman con mayor facilidad a un pH próximo a 6,0, correspondiente a los valores medios que se encuentran en el rumen (KOUPI-ABYAZANI *et al.*, 1993) y que se disocian a pH menor de 3,5 o superior a 8,5 (JONES y MANGAN, 1977). SPENCER *et al.* (1988) observaron que cuando el pH aumentaba por encima de 9, la magnitud de la formación de complejos tanino-proteína disminuía rápidamente. En estas condiciones, la unión se realiza mediante enlaces no covalentes, de gran fuerza, en lugar de iónicos o covalentes. Además, se ha observado que la unión se hace más fuerte a medida que avanza el tiempo (TERRIL *et al.*, 1994) y cuanto más insoluble en agua sea la molécula de tanino (SPENCER *et al.*, 1988).

La asociación de polifenoles con proteínas es principalmente un fenómeno superficial. La eficacia de la unión de los polifenoles a la proteína deriva del hecho de que los primeros son multidentados y, por tanto, capaces de unirse simultáneamente a más de un punto de la superficie de la proteína. En la formación del complejo tanino-proteína participan distintos

tipos de enlaces (VAN BUREN y ROBINSON, 1969; HAGERMAN y BUTLER, 1981; KUMAR y SINGH, 1984):

- Puentes de hidrógeno, que se forman entre los radicales hidroxilo de los grupos fenólicos y el oxígeno del grupo carbonilo y amido del enlace peptídico de las proteínas.
- Enlaces covalentes, que se forman mediante la oxidación de los fenoles a quinonas y subsiguiente condensación con el grupo nucleofílico de la proteína.
- Interacciones hidrofóbicas entre el anillo aromático del compuesto fenólico y las regiones hidrofóbicas de la proteína.
- Enlaces iónicos, que se establecen entre el anión fenolato y el lugar catiónico de la molécula de proteína.

En el fenómeno de precipitación de la proteína por los polifenoles, se pueden presentar diversas situaciones:

- A baja concentración de proteína, los polifenoles se unen a uno o más sitios de la superficie proteica, formándose una monocapa que es menos hidrofílica que la propia proteína. La agregación va seguida de precipitación.
- Cuando la concentración de proteína es elevada, la capa superficial hidrofóbica se forma por el acomplejamiento del polifenol a la proteína y por uniones cruzadas entre diferentes moléculas de proteína, mediante polifenoles multidentados. La agregación va seguida de precipitación. Esta tendencia a la formación de uniones cruzadas de moléculas de proteína a elevada concentración de la misma, explica el cambio de la estequiometría de los agregados al cambiar la concentración de la proteína. En una solución diluida se requiere mayor cantidad de polifenoles para precipitar las proteínas que en una concentrada (SPENCER *et al.*, 1988).
- Los fenoles simples podrían ser capaces de precipitar la proteína de una solución, si mantienen en la solución una concentración suficiente para empujar el equilibrio a favor del complejo fenol-proteína y así, formar una capa hidrofóbica de las moléculas de fenoles simples, en la superficie de la proteína.

El complejo tanino-proteína puede ser disociado por la adición de más proteínas (NEIRENSTEIN, 1932), solventes hidrofóbicos, vínculos de hidrógeno aceptores de solventes (ej. acetona), urea, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, detergentes no iónicos, aniónicos y cationicos o heterociclos de nitrógeno (cafeína) (SPENCER, 1988).

Aunque la acción de los TC se ejerce esencialmente sobre las proteínas, también se han observado sus efectos sobre los carbohidratos, particularmente la hemicelulosa, la celulosa,

el almidón y las pectinas (BARRY y MANLEY, 1984; CHIQUETTE *et al.*, 1988; AUSTÍN *et al.*, 1989; KUMAR y VAITHIYANATHAN, 1990; SCHOFIELD *et al.*, 2001).

2.3.2. Efecto de los taninos sobre la microbiota ruminal.

El efecto de los taninos sobre los microorganismos ruminales varía en función de su naturaleza, concentración, estructura y peso molecular; del resto de los componentes de la dieta y de la especie animal, pudiendo afectar positiva o negativa a la producción microbiana (AERTS *et al.*, 1999).

Los efectos favorables se presentan con concentraciones moderadas de los TC (2 a 4%), mientras que éstos ejercen efectos nocivos cuando están presentes en concentraciones relativamente elevadas (6 a 12 %).

Los efectos adversos de los taninos los resumen GETACHEW *et al.* (2000) en los siguientes: baja ingesta y digestibilidad; inhibición de enzimas digestivas y microbianas (SILANIKOVE *et al.*, 1994; SILANIKOVE, 1996a; AHARONI *et al.*, 1998); pérdida de proteína endógena y efectos sistémicos, como resultado de la asimilación de productos degradados de los taninos hidrolizables en el tracto digestivo.

La reducción de la actividad microbiana y enzimática disminuye el nivel de ácidos grasos volátiles en el rumen (ROBBINS *et al.*, 1987; MAKKAR *et al.*, 1995c) lo que, a su vez, afecta negativamente a la preferencia del alimento que contiene taninos por el animal (VILLALABA y PROVENZA, 1996, 1997a,b,c, 1999).

La presencia de componentes no nutritivos, como los taninos, ha sido considerada como posible causa de la reducción de la degradabilidad de *Calliandra* en el rumen (AHN *et al.*, 1989; DZOWELA *et al.*, 1995; PERRERA *et al.*, 1996; SALAWU *et al.*, 1999b).

Los taninos condensados libres representan aquellos que exceden la capacidad de unirse a las proteínas vegetales. Reaccionan con las proteínas de las paredes celulares del intestino o con los enzimas de los microorganismos ruminales (MAKKAR *et al.*, 1990; SCALBERT, 1991; FIELD y LETTINGA, 1992; MUHAMMED *et al.*, 1994; ODENYO y OSUJI, 1997; SALAWU *et al.*, 1998). BARRY (1988) sugiere que la digestión del nitrógeno puede ser limitada por un exceso de taninos libres. La interacción de los taninos libres con los microorganismos en el rumen es probablemente menor de la esperada ya que al pH ruminal, los taninos forman complejos con los componentes orgánicos incluyendo polisacáridos, proteínas y minerales (JANSMAN, 1993). De hecho, se ha demostrado que esta interacción resulta en una pérdida neta del 78% de los taninos libres en el rumen de cabra y oveja (PÉREZ MALDONADO y NORTON, 1996).

La producción de AGV durante la fermentación *in vitro* puede reducirse hasta 5 veces o más cuando el sustrato contiene más del 6% de taninos condensados (VAN HOVEN y FURSTENBURG, 1992). Esta depresión en el proceso de fermentación podría ser el resultado de: i) la interacción directa entre los taninos y la pared celular de las bacterias o las membranas de los protozoos (HENIS *et al.*, 1964; JONES *et al.*, 1994); ii) el efecto de los taninos sobre los enzimas de los microorganismos ruminales (TAGARI *et al.*, 1965; BAE *et al.*, 1993) o iii) el efecto de los taninos de bajo peso molecular o fenoles no tánicos sobre el metabolismo de los microorganismos ruminales (AKIN *et al.*, 1988). VAITHIYANATHAN (1990) y MAKKAR y BECKER (1996) observaron, *in vitro*, una reducción de los AGV de cadena corta en presencia de taninos.

Las proantocianidinas tienen una importante papel en la actividad de la microbiota ruminal a bajas concentraciones. Sus efectos beneficiosos están asociados con una mayor disponibilidad y absorción de aminoácidos. Protegen a las proteínas vegetales de la degradación ruminal (JONES y MANGAN, 1977; BARRY y DUNCAN, 1984; BARRY y REID, 1984; MANGAN, 1988; TANNER *et al.*, 1994; MCNABB *et al.*, 1996; SILANIKOVE *et al.*, 1996a; AERTS *et al.*, 1999; SALAWU *et al.*, 1999b; BABA *et al.*, 2002). MAKKAR *et al.* (1995a) han demostrado que los taninos aumentan la eficiencia de síntesis de la proteína microbiana en un sistema *in vitro* que contenía microorganismos ruminales. Los taninos son antioxidantes y, posiblemente, podrían tener un efecto beneficioso sobre la microbiología del rumen al disminuir la oxidación potencial del ecosistema ruminal. Las propiedades anticarcinogénicas de los taninos de los árboles y arbustos forrajeros han sido también demostradas por PERCHELLETE *et al.* (1996).

Una pequeña cantidad de PA en la dieta puede mejorar la cantidad de proteína procedente del rumen y disponible en el intestino delgado (WAGHORN *et al.*, 1987). De este modo, se mejora la eficiencia de producción en el rumen (TERRILL *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 1996b,c; MIN *et al.*, 1999).

El pH del rumen oscila entre 6,0 y 7,0 lo que permite la formación de complejos estables entre PA y proteína y así, las PA pueden ejercer su efecto inhibitorio de la degradación de la proteína de la planta en el rumen, a través de su protección frente al ataque de las proteasas; de la inhibición directa de las proteasas ruminales o de una combinación de ambos efectos. Las PA reducen la degradación de la proteína de las plantas y la producción de amonio en el rumen y aumentan el flujo de la proteína al intestino (WAGHORN *et al.*, 1987,1994; MCNABB *et al.*, 1996). Diversos autores (KHAZAAL *et al.*, 1994; BRODERICK y ALBERCHT, 1997) corroboran estas observaciones

responsabilizando de esta reducción de la velocidad de degradación del alimento a la presencia de taninos en la dieta.

2.3.3. Mecanismo de adaptación de la microbiota ruminal a la presencia de taninos en la dieta del rumiante.

El efecto de las PA sobre el ecosistema del rumen, a largo plazo, no es conocido, aunque algunos autores (KRUMHOLTZ y BRYANT, 1985, 1986a,b) han indicado una gran capacidad potencial de adaptación de los microorganismos ya que algunas especies de bacterias del rumen pueden crecer metabolizando fenoles (MOLINA *et al.*, 1999; MCSWEENEY *et al.*, 2001).

Una importante adaptación de los microorganismos ruminales a los efectos no nutritivos de los forrajes que contienen taninos puede implicar la degradación microbiana de estos compuestos. Los polifenoles de las plantas sufren diversos grados de transformación y degradación por los microorganismos durante su paso a través el tracto gastrointestinal del rumiante (MARTIN, 1982; GOODCHILD, 1989; AHN, 1990; HAGERMAN *et al.*, 1992; PÉREZ MALDONADO y NORTON, 1996; FOLEY *et al.*, 1999; SINGH *et al.*, 2001). Los fenoles glucosídicos (flavonol) son metabolizados en el rumen por los microorganismos, mediante la hidrólisis de los grupos glucosídicos y la división del anillo heterocíclico (LOWRY y KENNEDY, 1996; MCSWEENEY y MACKIE, 1997). Los productos que resultan de esta degradación en el rumen incluyen acétato, butirato, di y monohidroxifenoles y floroglucinol (CHENG *et al.*, 1969; SIMPSON *et al.*, 1969; ODENYO *et al.*, 2001). La degradación de los taninos condensados, mediante la ruptura de uniones carbono-carbono, no ha podido ser demostrada bajo condiciones anaeróbicas. Por tanto, podría no ocurrir en el rumen del animal (MCSWEENEY *et al.*, 2001b) a pesar de que PÉREZ MALDONADO y NORTON (1996) observaron la desaparición aparente de los TC en el tracto gastrointestinal.

Los taninos hidrolizables son hidrolizados y degradados en el rumen a glucosa y ácido galico, por la acción de bacterias de las especies *Selenomonas ruminantium* y *Streptococcus spp.* que producen esterasas y tanino-acilhidrolasas (OSAWA y WALSH, 1993; NELSON *et al.*, 1995, 1998; SKENE y BROOKER, 1995; ODENYO *et al.*, 2001). El ácido galico se degrada en el rumen a acétato y butirato (KRUMHOLTZ y BRYANT, 1986a; MURDIATI *et al.*, 1992) por la acción de bacterias de las especies *Eubacterium oxidoreducens*, *Streptococcus Bovis*, *Syntrophococcus sucromutans*, *Coprococcus sp.* (TSAI *et al.*, 1976; KRUMHOLTZ y BRYANT, 1986a, b). Por ello, algunos autores han señalado que estos taninos podrían no tener efecto significativo sobre

la degradación ruminal de los alimentos (HAGERMAN *et al.*, 1992; FOLEY *et al.*, 1999). Sin embargo, otros (GONZÁLES *et al.*, 1998; HERVÁS *et al.*, 2000b) si han observado un efecto reductor.

Los polifenoles ejercen efectos sobre los microorganismos ruminales, actuando sobre las paredes celulares de las bacterias y las enzimas extracelulares, secretadas por esas bacterias, e inhiben el transporte de los nutrientes en las células y retrasan el crecimiento de la microbiota ruminal. SMART *et al.* (1961) y BELL *et al.* (1965) observaron que los taninos condensados de *Lespedeza cuneata* inhibían la celulasa y la pectinasa en el líquido ruminal. BAE *et al.* (1993), en ensayos *in vitro*, observaron que los taninos condensados de *Lotus corniculatus*, en una concentración entre 100 y 400 $\mu\text{g/ml}$, inhibían la actividad de la endoglucanasa extracelular y de las células asociadas de *Fibrobacter succinogenes*. JONES *et al.* (1994) observaron que los TC de *Onobrychis viciifolia*, reducían el crecimiento de las bacterias proteolíticas (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminobacter amylophilus* y *Streptococcus bovis*) aunque cepas de *Prevotella ruminicola* toleraban concentraciones de taninos de hasta 600 $\mu\text{g/ml}$.

En los últimos años, los trabajos realizados se han centrado en la identificación de los microorganismos que toleran altas concentraciones de taninos habiéndose identificado varias especies (BROOKER *et al.*, 1994; SKINE y BROOKER, 1995; TJAKRADIDJAJA *et al.*, 1997; NELSON *et al.*, 1998; ODENYO y OSUJII, 1998; ODENYO *et al.*, 2001).

Diversas especies de bacterias ruminales responden a la presencia de taninos mediante la inducción de cambios en su morfología (NICHOLSON *et al.*, 1986; BAE *et al.*, 1993; JONES *et al.*, 1994; MCALLISTER *et al.*, 1994a; BROOKER *et al.*, 2000). En este sentido, CHIQUETTE *et al.* (1988) observaron una modificación de la morfología de los microorganismos del rumen como respuesta a la presencia de PA a una concentración elevada, concretamente la inducción de la formación del glicocaliz en las bacterias. Estos mismos autores mostraron, mediante microscopía electrónica de transmisión, que las bacterias ruminales forman múltiples microcolonias adherentes sobre las hojas y tallos de plantas, con un elevado contenido en PA. Dichas colonias no penetraban en los tejidos de la planta mientras que si lo hacían las bacterias asociadas con cadenas cortas de taninos. Del mismo modo, O'DONOVAN y BROOKER (2001) observaron que, en presencia de taninos, *Streptococcus gallolyticus* produce grandes cantidades de matriz extracelular, relacionada con la pared bacteriana celular y que, en comparación con *Streptococcus bovis*, presentaba una menor cantidad de manosa, lo cual indica una modificación de su pared celular. BROOKER *et al.* (1995) observaron, en un estudio *in vitro*, que las bacterias de la especie *Streptococcus caprinus*

crecían en presencia de ácido tánico, en concentraciones situadas por encima de 2,5% p/v, mientras que las de especie *S. Bovis* fueron inhibidas con una concentración de 0,25% p/v. Las primeras metabolizan ácido galico, produciendo pirogalol, aunque éste no es metabolizado y producen polisacáridos extracelulares como mecanismo de defensa que les permite mantenerse en medios con altas concentraciones de taninos. *Selenomonas ruminantium* K2 crece en presencia de taninos hidrolizables o condensados, como única fuente de carbono y secreta tanino-acilhidrolasa, como mecanismo de adaptación. TJAKRADIDJAJA *et al.* (1997), basándose en su morfología, aislaron 20 especies de bacterias del líquido ruminal de cabras y camellos que eran resistentes a los taninos de *Acacia sp* y *Caliandra callothyrsus*. Estas bacterias se agrupan en los géneros *Streptococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Megasphaera sp.*, *Selenomonas sp.* y *Clostridium sp.* ODENYO *et al.* (2001) aislaron bacterias de la especie *Butyrivibrio fibrisolvens* del rumen de animales que consumían hojas de arbustos con elevadas concentraciones de taninos. Las bacterias que aislaron estos autores no sintetizan tanino-acilhidrolasa, pero son capaces de hidrolizar o tolerar ácido tánico. Por tanto, la hidrólisis no parece únicamente debida a las tanino-acilhidrolasas sino que también deben estar implicados otros mecanismos que no son todavía conocidos. NELSON *et al.* (1998) aislaron bacterias de la especie *Eubacterium cellulosolvens* del rumen de ciervos y observaron que estas bacterias celulolíticas crecían en medios que contenían más de 20 mM de pirogalol, floroglucinol, ácido p-cumárico o ácido galico. Estas bacterias toleraban una concentración de TC purificados de *Desmodium ovifolium* y ácido tanino de 0,5 y 2 g/l, respectivamente. ODENYO *et al.* (2001) aislaron bacterias de *Streptococcus sp.* (gram-positivas) que tienen la capacidad de crecer en un medio en el que la concentración de ácido tánico no supere 3% p/v.

MAKKAR *et al.* (1995a), utilizando fermentadores de flujo semicontinuo, observaron que la adición de 0,4 mg/ml de taninos de quebracho no inducían los enzimas capaces de degradar esos taninos en los microorganismos ruminales. Sin embargo, a partir de 0,2 mg/ml, el número de protozoos se reducía.

VALDEZ *et al.* (1986), en un sistema de cultivo semicontinuo, observaron que los metabolitos secundarios de *Yuca schidigera* disminuyeron el número de protozoos y no el de las bacterias. LU *et al.* (1987) encontraron que las bacterias cambiaban de aspecto morfológico en presencia de factores no nutritivos en los vasos de fermentación.

Los hongos del rumen crecen en presencia de PA, probablemente debido a la formación del complejo tanino-proteína (MCALLISTER *et al.*, 1994).

La diversidad de los microorganismos ruminales tolerantes a los taninos está probablemente mal representada por las pocas especies aisladas, que han sido recientemente descritas (MCSWEENEY *et al.*, 2001). Por lo tanto, la tolerancia de los protozoos, hongos y bacterias fibrolíticas a los polifenoles requiere más investigación así como el papel de estos microorganismos en el metabolismo de los forrajes que contienen taninos.

2.3.4. Efecto de la adición de PEG sobre la fermentación ruminal.

En la actualidad existen diversos trabajos encaminados a tratar de reducir el efecto negativo de los taninos presentes en los alimentos (MURDIATI *et al.*, 1990; 1991; SILANIKOVE *et al.*, 1994; 1996a, b; MAKKAR *et al.*, 1995b; KHAZAAL *et al.*, 1996; DEGEN *et al.*, 1998; BEN SALEM *et al.*, 1999a, b; 2000; SAARISALO *et al.*, 1999; DECANDIA *et al.*, 2000; GILBOA *et al.*, 2000; JONES *et al.*, 2000; MAKKAR, 2000; MCNEILL *et al.*, 2000; MOUJAHED *et al.*, 2000; PROVENZA *et al.*, 2000; MARTÍN GARCÍA, 2001; TITTUS *et al.*, 2001; YÁÑEZ RUIZ, 2003). Los mencionados autores han utilizado diversos agentes bloqueantes de los taninos tales como polímeros artificiales polivinilpirrolidona (PVP), polivinilpolipirrolidona (PVPP), polietilenglicol (PEG), carbonato cálcico, etc.

El PEG (HO-CH₂(CH-OCH₂)_n-CH₂-OH) es un detergente no iónico que se acompleja con los taninos hidrolizables y condensados, en un rango de pH que oscila entre 2 y 8,5 (JONES, 1965; OH *et al.*, 1980; SILANIKOVE *et al.*, 1996b). El PEG contiene un gran número de átomos de oxígeno, capaces de establecer uniones de hidrógeno con grupos fenólicos de taninos (JONES, 1965). Se ha utilizado PEG de peso molecular que varía entre 2000 y 35000 para evitar las uniones entre los taninos y las proteínas (SILANIKOVE *et al.*, 1994; MAKKAR *et al.*, 1995b; KHAZAAL *et al.*, 1996). Se ha observado que la afinidad del PEG por los taninos es tan elevada que la adición de este agente químico puede llegar, incluso, a desplazar a las proteínas del complejo tanino-proteína, formado previamente (BARRY y MANLEY, 1986). De ahí su gran efecto potencial para neutralizar el efecto negativo de los taninos condensados (LANDAU *et al.*, 2000).

El PEG se une a los taninos y aumenta la disponibilidad de ciertos macronutrientes, particularmente, de la proteína. Estudios de degradabilidad, *in situ* e *in vitro*, han mostrado una respuesta positiva de la incubación de las muestras de plantas que contienen taninos con agentes bloqueantes de estos, en comparación con las muestras no tratadas (LAURENA *et al.*, 1984; CARRIDO *et al.*, 1991; KHAZAAL *et al.*, 1993; BARROGA *et al.*, 1995; MAKKAR *et al.*, 1995c; MCSWEENEY *et al.*, 1999). BEN SALEM *et al.* (1999b) encontraron también una

mejora en la degradabilidad de la MS de *Acacia Cyanophylla* suplementada con PEG. Esa mejora representa un índice del efecto adverso de los TC sobre la degradación ruminal. Sin embargo, la adición de PEG a las plantas libres de taninos no aumenta ni la producción de gases *in vitro* (MAKKAR *et al.*, 1995c; BABA *et al.*, 2002), ni la degradabilidad *in situ* (SILANIKVE *et al.*, 1996c). Por lo tanto, se puede concluir que el efecto positivo del PEG sobre la degradación de la materia seca está relacionado con la neutralización de los efectos adversos de los taninos.

SILANIKOVE *et al.* (1996b) obtuvieron un aumento de la fermentación ruminal, reflejada por un aumento de las concentraciones de amonio y de AGV en el líquido ruminal. NUÑEZ-HERNÁNDEZ *et al.* (1991) y WAGHON y SHELTON (1995) encontraron también un aumento en la concentración de N-NH₃ ruminal con la adición de PEG a dietas con altas concentraciones de TC, lo que hace pensar que el PEG inactiva una parte de los TC en el rumen.

MARTÍN GARCÍA (2001), utilizando fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o caprino, y tratando orujo de aceituna de “dos fases” y hoja de olivo con distintas concentraciones de PEG (0, 2 y 20 g/100 g de orujo) obtuvo un aumento en la producción de AGV totales y de nitrógeno total para la concentración del 20%.

2.4. SUPLEMENTACIÓN DE DIETAS POBRES EN CARBOHIDRATOS FERMENTABLES Y NITRÓGENO.

En general, los materiales lignocelulósicos se caracterizan por sus deficiencias en carbohidratos fácilmente fermentables y en proteína, lo que implica que aportan insuficiente energía y nitrógeno para el crecimiento de los microorganismos ruminales. Por tanto, esos materiales deberían suplementarse con otros alimentos que aporten esos elementos deficitarios para lograr mantener una eficiencia aceptable de la fermentación ruminal. La sincronización del suministro de energía y nitrógeno al rumen es una de las más prometedoras aproximaciones para mejorar la eficiencia de la fermentación ruminal (ROOKE *et al.* 1987; ROOKE y ARMSTRONG, 1989).

Suplementación con fuentes de nitrógeno.

El suministro adecuado de proteína a la dieta es esencial para que los microorganismos ruminales puedan sintetizar sus proteínas de manera adecuada. La máxima fermentación

ruminal se caracteriza por una elevada digestión ruminal de la materia seca, conjuntamente con una óptima eficiencia bacteriana. Esta función parece depender, en gran parte, de la energía dietética y de la proteína proporcionadas, en cantidades y con velocidades de degradación apropiadas. Sin embargo, la relación entre los carbohidratos disponibles fermentados y la proteína no es clara. Basándose en estudios de cultivos puros, algunos modelos nutricionales asumen que las bacterias celulolíticas fermentan los carbohidratos estructurales, utilizando el amonio como la única fuente de N, mientras que las bacterias que utilizan los carbohidratos no estructurales tienen un requerimiento fijo de aminoácidos preformados (RUSSELL *et al.* 1992). Estudios recientes han cuestionado esta suposición, demostrando que las bacterias que fermentan los carbohidratos estructurales no utilizan una proporción fija de N microbiano derivado del amonio sino que esta varía en función de la fuente de N disponible (ATASOGLU *et al.* 1998, 1999). Se ha sugerido que estas bacterias pueden usar péptidos y aminoácidos como fuentes de nitrógeno cuando estos están disponibles, en cultivos puros (LING y ARMSTEAD, 1995; WALLACE *et al.* 1999) y en cultivos mixtos de la población ruminal (MOLINA *et al.*, 1996; CARRO *et al.*, 1999b; CARRO y MILLER, 1999b). No obstante, los estudios que se han llevado a cabo en este área resultan contradictorios. En algunos estudios, proporcionando nitrógeno no amoniacal (aminoácidos, péptidos, proteína) se ha demostrado una estimulación del crecimiento de las bacterias del rumen *in vitro* (QUAZI y THOMSON, 1984; MERRY *et al.*, 1990; CRUZ SOTO *et al.*, 1994; GRISWOLD *et al.*, 1996; CARRO y MILLER, 1999b) e *in vivo* (CHIKUNYA *et al.* 1996). En otros estudios no se observó el mismo efecto ni en cultivo continuo (KERNICK, 1991) ni *in vivo* (FUJIMAKI *et al.*, 1989). Estos resultados opuestos pueden ser explicados por las diferencias en la composición de las dietas y, también, en el procedimiento utilizado para la determinación de la síntesis de proteína microbiana (RANILLA *et al.*, 2001).

CRUZ SOTO *et al.* (1994) proponen la hipótesis de que existe un punto de inflexión en la respuesta de los microorganismos a los aminoácidos preformados. Por debajo de este punto, los péptidos y los aminoácidos no tendrían efecto sobre la síntesis de proteína microbiana porque la fuente de energía no permitiría el crecimiento rápido. Por encima de ese punto, el crecimiento microbiano estaría limitado por la disponibilidad de nitrógeno más que por la fuente de energía si aquél sólo está presente en forma de amonio.

Puesto que el N amoniacal es la principal fuente de nitrógeno para los microorganismos, en numerosos estudios se ha pretendido establecer la concentración de amoniaco en el líquido ruminal o el aporte de nitrógeno degradable que permite un crecimiento óptimo de las poblaciones microbianas. A pesar de ello, sigue existiendo una cierta controversia en

relación a este punto. En ensayos *in vitro* (BAS *et al.*, 1989; HOOVER *et al.*, 1989; STOKES *et al.*, 1991a), se ha observado un aumento significativo en la eficiencia de síntesis microbiana y en la digestibilidad de los carbohidratos al incrementar la disponibilidad de proteína degradable del 5 al 22%.

En lo que se refiere a la concentración mínima de amoníaco que permite un crecimiento microbiano máximo, SATTER y SLYTER (1974) sugirieron que el aumento de la concentración de N-NH₃ ruminal por encima de 5 mg/100 ml en el fluido ruminal no mejora la producción de proteína microbiana. SCHAEFER *et al.* (1980) observaron que la mayoría de las bacterias ruminales podían utilizar el amonio en concentraciones tan bajas como 0,68 mg/100 ml. Sin embargo, algunos autores incluso señalan cantidades de hasta 20 mg/100 ml (PERDOCK *et al.*, 1988) como más adecuadas para alcanzar un crecimiento microbiano óptimo en el rumen.

En cuanto a la idoneidad relativa del nitrógeno proteico frente al nitrógeno no proteico, MOLINA ALCAIDE *et al.* (1996) observaron *in vitro* una mayor producción de AGV en fermentadores de flujo continuo que se alimentaban con dietas a base de arbustos y se suplementaban con torta de girasol en comparación con los valores que se obtenían cuando el nitrógeno suplementario procedía de la urea. MARTÍN GARCÍA (2001), observó el mismo efecto y mostró que la adición de torta de girasol a fermentadores de flujo continuo, inoculados con líquido ruminal de ovino o caprino, y alimentados con subproductos del olivar, incrementaba la producción diaria de AGV totales y de nitrógeno bacteriano en los efluentes, frente a lo que ocurría cuando se suplementaba con urea. RANILLA *et al.* (2001), en ensayos *in vitro*, encontraron también un aumento en la producción diaria de los AGV cuando la urea fue sustituida por nitrógeno proteico.

Suplementación con alimentos ricos en carbohidratos solubles.

Los granos de leguminosas son alimentos concentrados, con alto contenido en materia seca, un nivel de proteína, en general, superior al 20%, con un 50-70% de carbohidratos solubles y alrededor del 8% de fibra total (CUBERO y MORENO, 1983). Las habas (*Vicia faba*) contienen factores no nutritivos que pueden reducir su valor biológico (MARQUARDT, 1983). Entre estos, los taninos que reducen la digestibilidad *in vitro* de su MS en cerca del 5% (BOND, 1976). El desarrollo de los taninos en las habas ayuda a aumentar la calidad nutricional de esta legumbre. Por otra parte, los taninos pueden jugar un papel importante en las plantas, como aumentar la resistencia de las raíces a las enfermedades (STATLER,

1970), reducir la atracción de los pájaros por las semillas y prevenir el ataque de los hongos durante la germinación (HARRIS, 1969). Junto a los granos de cereales, los de leguminosas pueden constituir una fuente suplementaria de energía y proteína muy importante para los rumiantes en la zona del Mediterráneo, donde abundan las plantas forrajeras altamente fibrosas. Las leguminosas pueden cubrir las deficiencias que tienen esas plantas fibrosas en cuanto a carbohidratos fácilmente degradables y a proteína.

Con respecto al efecto del nivel de suplementación con carbohidratos sobre la degradación y la digestión de los materiales lignocelulósicos, las opiniones son contradictorias. Algunos autores (LINDBERG *et al.*, 1984; HUHTANEN y KHALILI, 1992) en ensayos *in vivo*, y otros (RUSSELL y DOMBROWSKI, 1980; VAN GYLSWYK y SCHWARTZ, 1984; GRANT y MERTENS, 1992) en ensayos *in vitro* han observado un efecto negativo de la adición de carbohidratos solubles sobre la fermentación de materiales lignocelulósicos, mientras que otros obtuvieron un efecto positivo tanto *in vivo* (SILVA y ØRSKOV, 1988) como *in vitro* (STEWART *et al.*, 1979; DEMEYER, 1981; DURANT, 1989) con suplementos de carbohidratos solubles.

ROHR (1986) no observó una mejora en la eficiencia de la síntesis bacteriana, expresada en, g de nitrógeno bacteriano/kg de MS de dieta, cuando los carbohidratos no estructurales superaban el 45% de la dieta. DEMEYER (1981), en un estudio *in vitro*, comprobó el efecto estimulante que sobre la celulosa tiene la adición de cantidades de carbohidratos fácilmente fermentables entre 5 y 10% de la dieta. STOKES *et al.* (1991a) observaron una mejora en la eficiencia de síntesis bacteriana cuando los carbohidratos pasaban de 25 a 37% de la materia seca de la dieta. RODE *et al.* (1985), OSHIO *et al.* (1987) y WANDERLEY *et al.* (1987) obtuvieron un aumento en el flujo de nitrógeno microbiano cuando la dieta se cambió del 100% de forraje al 80% de concentrado.

Sin embargo, otros trabajos (CHAMBERLAIN y THOMAS, 1979; MATHERS y MILLER, 1981; OLDHAM *et al.*, 1979) han encontrado una disminución en la eficiencia de síntesis bacteriana cuando el concentrado superaba el 30% de la MS de la ración. STEWART *et al.* (1979), incubando *in vitro* paja de cebada con distintas proporciones de almidón durante 42 horas, observaron que el efecto positivo de la suplementación sobre la digestión de paja cesó a partir del 33% de adición de almidón. BOCHI-BRUM *et al.* (1999) observaron, en ovejas que consumían dietas con distintos porcentajes de concentrado, que la digestibilidad *in vitro* de diversos forrajes y la actividad de los microorganismos celulolíticos se afectaban negativamente al aumentar el nivel de concentrado en la ración.

Una dieta a base de forraje y con una elevada concentración en carbohidratos fácilmente solubles altera la fermentación ruminal, provoca un descenso en la digestión de la fibra asociado con una caída del pH por debajo de 6,0 y puede reducir la velocidad de crecimiento de las bacterias celulolíticas (CHURCH, 1988; MOULD, 1988; ARCHIMÈDE *et al.*, 1996). Diversos autores han podido constatar, en experimentos *in vitro*, descensos graduales en la tasa de crecimiento y la actividad de las especies bacterianas celulolíticas a medida que disminuye el pH (RUSSELL *et al.*, 1979; HILTNER y DEHORITY, 1983; GRANT y MERTENS, 1992; FONDEVILA *et al.*, 1994). El efecto del descenso del pH se hace notar no sólo a nivel de la producción de masa microbiana -especialmente de las bacterias celulolíticas (RUSSELL y DOMBROWSKI, 1980)- sino que también inhibe la actividad enzimática (SMITH *et al.*, 1973; HUHTEN y KHALILI, 1992) y la adhesión bacteriana a las partículas de alimento (ROGER *et al.* 1990).

El tipo de carbohidratos utilizados como suplemento de los alimentos lignocelulósicos tiene una importante influencia sobre la fermentación de estos alimentos. El efecto de estos carbohidratos depende de sus velocidades de degradación y de fermentación. En general, la cebada es fermentada más rápidamente que el maíz (CONE *et al.*, 1989). YANG *et al.* (1997) observaron una mayor producción de AGV y de síntesis de proteína microbiana, cuando la dieta se suplementaba con cebada en comparación con el maíz. También, FENG *et al.* (1995) observaron una mayor degradabilidad del forraje cuando la dieta fue suplementada con cebada en comparación con el maíz. FONDEVILA *et al.* (1994) observaron una mayor producción de acetato y menor proporción de propionato, suplementando paja de cereales con pulpa de remolacha en comparación con la cebada. BARRIOS *et al.* (2002) obtuvieron un aumento en la producción de gas y de acetato cuando la dieta fue suplementada con pectina en comparación con el almidón.

BARRIOS *et al.* (2000), en estudios *in vitro*, encontraron un efecto positivo de la adición de carbohidratos (almidón y pectina) sobre sustratos celulósicos de baja calidad, observándose un aumento en el número de bacterias que se adhieren a las paredes celulares. La adición de concentrado tiene una clara ventaja cuando se suministra a una dieta completamente forrajera o a una dieta de baja calidad lo que corroboran las observaciones realizadas por YÁÑEZ RUIZ (2003) *in vivo*, con animales que consumían hoja de olivo suplementada con leguminosas grano.

2.5. CAPACIDADES FERMENTATIVAS DEL RUMEN DE OVINO Y CAPRINO.

Desde los albores de la humanidad hasta nuestros días, la cabra ha constituido una de las especies domésticas más importantes para el hombre junto a las ovejas, como fuentes de alimento, vestido y abonos orgánicos de alta calidad.

En general, las diversas investigaciones realizadas han demostrado que no existen grandes diferencias entre las diversas especies de rumiantes en cuanto a su capacidad para digerir los distintos nutrientes (NDOSA, 1980; MOHAMMED, 1982; BROWN y JONSON, 1984; ALAM *et al.*, 1987). Algunos autores consideran que el ovino posee una mayor eficiencia digestiva de los nutrientes totales que el caprino o que las diferencias interspecíficas son mínimas, siempre que se trate de alimentos de mediana-alta calidad; si éstos son de calidad mediana la especie caprina muestra una cierta superioridad con respecto a la ovina y esa superioridad se manifiesta claramente cuando los alimentos son de mala calidad (EL HAG, 1976; WATSON y NORTON, 1982; ALAM *et al.*; 1983; SCHIND *et al.* 1983; DOYLE *et al.*, 1984; HOW *et al.*, 1988; DOMINGUE *et al.*, 1991).

En cuanto a la capacidad degradativa relativa, HADJIPANAYIOTOU *et al.* (1998b) encontraron resultados similares de la degradabilidad ruminal de harina de semilla de soja y harina de pescado en ovino y caprino. PÉREZ MALDONADO y NORTON (1996) no encontraron diferencias significativas en la degradabilidad aparente del nitrógeno dietético (0,50 y 0,45 en ovino y caprino, respectivamente) cuando los animales se alimentaban con arbustos forrajeros. ISAC *et al.* (1994) y MOLINA ALCAIDE *et al.* (2000), tampoco, encontraron diferencias significativas entre las dos especies en cuanto a la degradabilidad de la proteína bruta y de la materia seca de la dieta ofrecida. No obstante, MARTÍN GARCÍA (2001), ha encontrado valores de la degradabilidad de nitrógeno de la harina de torta de girasol más elevados en el rumen de ovino que en el de caprino. La velocidad de degradación de la materia seca tiende a ser más elevada en caprino que en ovino cuando la calidad del alimento disminuye (GARCÍA *et al.*, 1995; MOLINA ALCAIDE *et al.*, 1997).

En cuanto a los parámetros de la fermentación ruminal. Los resultados obtenidos son también variados y, a veces, contradictorios. Se acepta, de forma general, que la concentración de amonio en el rumen de caprino es más elevada que en el de ovino, cuando se les suministra forraje de baja calidad (BOHRA, 1980; WATSON y NORTON, 1982; CABRERA *et al.*, 1983; HADJIPANAYIOTOU y ANTONIOU 1983; SCHMID *et al.*, 1983; DOYLE *et al.*, 1984; ANTONIOU y HADJIPANAYIOTOU 1985; MASSON y FAURIE, 1989; DOMINGUE *et al.*, 1991; NÚÑEZ HERNANDEZ *et al.*, 1991; MARTÍN GARCÍA, 2001). Esto podría indicar interespecíficas en el reciclado del nitrógeno o en la eficiencia de síntesis de proteína microbiana. Las concentraciones de AGV en el líquido ruminal de las dos especies son

también afectadas por la naturaleza de la dieta. Cuando ambas especies reciben dietas de mala calidad, caprino muestra una mayor concentración de AGV que ovino (MASSON y FAURIE, 1989; MARTÍN GARCÍA, 2001). A pesar de que se acepta, de forma general, que ambas especies no muestran diferencias significativas ante dietas de mediana-buena calidad (WATSON y NORTON, 1982; HADJIPANAYIOTOU y ANTONIOU, 1983; ANTONIOU y HADJIPANAYIOTOU, 1985; GARCÍA *et al.*, 1995; MOLINA ALCAIDE *et al.*, 2000), la información deducida de trabajos comparativos resulta contradictoria. En este sentido, EL HAG (1976), ISAC *et al.* (1994) y PÉREZ MALDONADO (1996) han observado que las concentraciones de AGV totales eran más elevadas en el rumen de ovino que en el de caprino.

Los parámetros de la fermentación ruminal pueden afectar a la síntesis de proteína microbiana (HARRISON *et al.*, 1975; HADJIPANAYIOTOU *et al.* 1982; HADJIPANAYIOTOU y ANTONIOU, 1983). En relación a este último parámetro, EL HAG (1976) y HADJIPANAYIOTOU y ANTONIOU (1983) encontraron, en general, que la concentración de proteína microbiana era superior en el rumen de caprino que de ovino. No obstante, PÉREZ MALDONADO y NORTON (1996) no encontraron diferencias significativas en cuanto a la eficiencia de síntesis de proteína microbiana cuando ambas especies se alimentan con dietas de mediana calidad. Los valores eran similares a otros obtenidos en ovino alimentando con dietas similares (ARC, 1984; SCA, 1990). MARTÍN GARCÍA (2001) estimó, mediante distintas aproximaciones, la producción diaria y la eficiencia de producción del nitrógeno bacteriano en fermentadores de flujo continuo alimentados con dietas basadas en orujo de "dos fases" y en hoja de olivo y observó que la especie animal donadora del inóculo ruminal (ovino *vs* caprino) no afectó significativamente a ninguno de los parámetros considerados.

En los últimos años se han intensificado los estudios centrados en la ventaja aparente que tiene caprino sobre ovino en cuanto a la utilización de forrajes que contienen taninos (NASTIS y MALECHEK, 1981; ROBBINS *et al.*, 1987a; TEAGUE, 1989; BROOKER *et al.*, 1994, 1995; MARTÍN GARCÍA, 2001).

MOLINA ALCAIDE *et al.* (1999), en ensayos con fermentadores de flujo continuo, han obtenido resultados concordantes con los derivados de ensayos *in vivo* (MOLINA ALCAIDE *et al.*, 2000) ya que con dietas de mediana-buena calidad, no aparecen diferencias significativas entre ovino y caprino en los parámetros de la fermentación ruminal. GIZZI *et al.* (1998), comparando los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro*, observaron similitudes en cuanto a la degradabilidad y a la composición de la microbiota ruminal.

La información acerca de la actividad degradativa ruminal que es posible obtener con fermentadores, puede resultar de gran interés para dilucidar sobre la capacidad degradativa y digestiva de ovino y caprino, así como las posibles causas de esas diferencias ya que hay muy poca información procedente de estudios realmente comparativos y centrados en la fermentación ruminal *in vitro* (MOLINA ALCAIDE et al, 1999; MARTÍN GARCÍA, 2001; MOLINA ALCAIDE et al., 2003, en prensa). Los sistemas de simulación también presentan importantes ventajas económicas y prácticas si se comparan con los animales.

2.6. TÉCNICAS DE SIMULACIÓN.

2.6.1. Breve historia de la evolución de las técnicas de simulación.

Desde los años 40 se han desarrollado diversas técnicas de simulación aplicadas al estudio de la nutrición de rumiantes (HUNGATE, 1944). La necesidad de una técnica *in vitro* que pueda simular el metabolismo digestivo de rumiantes surgió como consecuencia de las dificultades que presenta el estudio *in vivo* de la microbiota ruminal. En general, el estudio de las funciones del rumen *in vivo* no es satisfactorio por las dificultades que implica la recogida de una muestra representativa, la precisión en el control del flujo ruminal o la medida de la producción de gases y metabolitos solubles que se absorben a través de la pared del rumen o que se liberan al medio (BRYANT y ROBINSON, 1968). A ello se añade el coste de los ensayos *in vivo* y la variabilidad inherente al uso de animales canulados.

PEARSON y SMITH (1943a, b) utilizaron por primera vez una técnica de simulación que consistía en un simple vaso en el que incubaba el contenido ruminal. Esta técnica fue utilizada extensamente en otros trabajos e incluso, a menudo, no se ha referido como un rumen artificial, sino como una simple incubación *in vitro* (BARNETT, 1957; BARNETT y REID, 1957).

Se han descrito y empleado con éxito varios tipos de sistemas de simulación ruminal (AAFJES y NIJHOF, 1967; HOOVER et al., 1976; CZERKAWSKI y BRECKENRIDGE, 1977; TEATHER y SAUER, 1988). Las técnicas de simulación que se utilizan en la actualidad, se pueden clasificar en 3 tipos principales (BLANCHART et al., 1989):

- a) Un tubo de incubación simple o contenedor, provisto de válvula de tipo Bunsen para la liberación de los gases de fermentación. Este aparato fue utilizado en los experimentos clásicos de MARSTON (1948). Con diferentes variaciones era el mismo que habían empleado HUNGATE et al. (1955). Más tarde, se incorporó a los sistemas de simulación el borboteo de gas y la agitación y, posteriormente, la conexión de un

sistema intermitente de recogida del gas de fermentación producido (CZERKAWSKI y BRECKENRIDGE, 1969). CZERKAWSKI y BRECKENRIDGE (1970), con una pequeña modificación, han utilizado las técnicas de simulación extensamente para llevar a cabo el estudio de los mecanismos de producción e inhibición de metano.

- b) Fermentadores de flujo continuo, como los utilizados en el presente trabajo. Se han empleado diversas formas: abiertos -sin recogida del gas de fermentación (HOBSON, 1965; AAFJES y NIJHOF, 1967; WELLER y PILGRIM, 1974; FUCHIGAMI *et al.*, 1989; MIETTINEN y SETÄLÄ, 1989; FELINER *et al.*, 1995; MOLINA ALCAIDE *et al.*, 1996; FELINER *et al.*, 1997; BACH *et al.*, 1999; MENG *et al.*, 1999; MARTÍN GARCÍA, 2001)- y diseñados para incubaciones prolongadas de muestras numerosas, o cerrados-con recogida del gas de fermentación (BOWIE, 1962; SLYTER *et al.*, 1964; SLYTER y PUTNAM, 1967; VATTHOUR *et al.*, 1970; SATTER y SLYTER, 1974; LU *et al.*, 1987; DAWSON *et al.*, 1990)-. El sistema cerrado es particularmente de utilidad para los estudios de la producción de gases, pero está diseñado incubaciones de corta duración. La eficiencia de agitación y el control de temperatura son muy importantes en este tipo de aparatos.
- c) Ssistemas semipermeables que son bastante popular (Low *et al.*, 1949; WARNER, 1956; DAVY *et al.*, 1960; DAWSON *et al.*, 1964; GARY *et al.*, 1965; HUNGATE, 1967). En este sistema se tiene en cuenta la permeabilidad de la pared del rumen, y se posibilita la retirada continua de los productos de la fermentación. Sin duda, el rumen artificial que simula las condiciones fisiológicas del rumen de una manera más aproximada, es el sistema semipermeable.

De este último sistema han derivado algunas variaciones con mayor o menor grado de complejidad (RUFENER *et al.*, 1963; DAWSON *et al.*, 1964; HOOVER *et al.*, 1976a; CZERKAWSKI y BRECKENRIDGE; 1977; AHARONI y TAGARI, 1991). Entre los aparatos que presentan ciertas complicaciones se encuentra el sistema semicontinuo del rumen artificial o "RUSITEC", diseñado y desarrollado por CZERKAWSKI y BRECKENRIDGE (1977). Este sistema permite determinar con precisión el "input" y el "output" de nutrientes y gases simulando la heterogeneidad del rumen. Está diseñado para estudiar la distribución, el flujo y la síntesis de proteína microbiana en un sistema complejo y heterogéneo. Sin embargo, el sistema abierto es predominante en los estudios que se realizan actualmente.

Algunos criterios para el éxito del diseño del rumen artificial son: a) la temperatura de incubación *in vitro* que debería ser la misma que en rumen (39°C). El control de la temperatura puede ser muy importante, cuando el aparato es muy complejo y se utiliza para

un largo periodo de incubación; b) el potencial redox del contenido ruminal es muy bajo y las provisiones deberían ser hechas para mantener ese bajo potencial redox *in vitro*; c) la facilidad para medir los parámetros ruminales; d) la eficiencia de agitación del fermentador; e) la separación de los productos finales de la fermentación y, e) la provisión para la medida de gases (CZERKAWSKI, 1986).

Es posible diseñar un rumen artificial mucho más complicado, pero también con mayores dificultades técnicas. En consecuencia, su reproducibilidad puede llegar a ser imposible. Por ello, parece conveniente utilizar el sistema de diseño más complejo para experimentos básicos de la función ruminal, y usar las versiones más sencillas para ensayos preliminares, o bien, para trabajos de monitorización o valoración (CZERKAWSKI, 1986). El uso de sistemas más simples tiene la ventaja adicional de que permite emplear un mayor número de réplicas en cada experimento dado que sus costes son menores que el de los sistemas más complicados y su manipulación resulta más simple.

2.6.2. Potencialidad de las técnicas de simulación para la valoración nutritiva de alimentos para rumiantes.

La aplicación de sistemas *in vitro* al estudio del metabolismo ruminal o de aspectos relativos a la microbiota ruminal es de una gran utilidad. La simulación de factores tales como la absorción de los productos de fermentación a través de la pared ruminal, las distintas velocidades de paso de los alimentos y la recogida de líquidos y gases resulta difícil (CZERKAWSKI y BRECKENRIDGE, 1975; HOOVER *et al.*, 1976; RÈMOND *et al.*, 1996). La fermentación ruminal *in vitro*, utilizando fermentadores de flujo continuo, supone una simplificación con grandes posibilidades para simular las condiciones del rumen en el estudio de las dinámicas de degradación de la proteína y de los carbohidratos en el rumen (MERRY *et al.*, 1990) o para determinar la combinación óptima carbohidratos-nitrógeno requerida para una adecuada actividad ruminal (BACH *et al.*, 1999). Otra importante aplicación de las técnicas de simulación *in vitro* fue encontrada en el estudio del valor nutritivo de alimentos individuales (MENKE *et al.*, 1979; CRAWFORD *et al.*, 1983). Mediante las técnicas *in vitro*, es posible seguir la respuesta metabólica de un alimento evitando la influencia ejercida por otros alimentos y, por lo tanto, describir su valor nutritivo. Es posible determinar los productos metabolizados del alimento que pueden resultar igualmente útiles para describir los efectos derivados del uso de aditivos y probióticos en la dieta de los animales. Las aproximaciones *in vitro* pueden ser también válidas para estudiar los efectos de sustancias tóxicas en el rumen. Los ensayos *in vitro*, permiten, por tanto

generar información sobre modelos de fermentación ruminal o de la síntesis de la proteína microbiana y de la digestibilidad de los nutrientes (KARUNANANDAA y VARGA, 1996) y son de gran utilidad para el diseño y clarificación de los ensayos *in vivo* (MERRY *et al.*, 1990). También se ha demostrado su validez en el control de calidad de los alimentos, incluidos forrajes de baja calidad (MORRISON y BRICE, 1984; JAYASURIYA *et al.*, 1988).

MANSFIELD *et al.* (1995) encontraron que los valores de digestibilidad de la materia seca y de la materia orgánica obtenidos en ensayos *in vivo* e *in vitro* eran similares. HANNAH *et al.* (1986) confirmaron estos resultados y añadieron que los valores de degradabilidad de la proteína y de los aminoácidos, obtenidos en los fermentadores *in vivo*, eran comparables. CRAWFORD *et al.* (1980) observaron que los valores de la digestibilidad obtenidos *in vitro* eran comparables a los obtenidos *in vivo* por diversos autores (HUNGATE, 1966; BINES y DAVEY, 1970; CHURCH, 1976) para la MS; para la celulosa y hemicelulosa (GRAY *et al.* 1958) y, para la FAD (COLE *et al.*, 1976). MANSFIELD *et al.* (1995) observaron que los valores de digestibilidad de la FND eran más bajos en fermentadores que en ensayos *in vivo*. Esta disminución fue atribuida a una disminución en el pH, que afecta a los microorganismos que degradan la FND (CHURCH, 1988; MOULD, 1988; ARCHIMÈDE *et al.*, 1996).

GIZZI *et al.* (1998) observaron que la degradabilidad de la materia seca muestra una tendencia similar *in vitro* e *in vivo* siendo sólo la fracción soluble significativamente diferente. Estos autores atribuyen esas diferencias al tipo de material de los sacos de nylon utilizados *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* en la fracción potencialmente degradable y su velocidad de degradación. En cuanto a la degradabilidad del nitrógeno, tampoco se observaron diferencias entre animales y fermentadores.

MANSFIELD *et al.* (1995) y GIZZI *et al.* (1998) encontraron que concentraciones de AGV totales más elevadas en los fermentadores que en ensayos *in vivo*. Esa mayor concentración fue atribuida a la no absorción de los AGV en el fermentador. En un estudio realizado por HANNAH *et al.* (1986) se observó que en los fermentadores aparecen concentraciones de AGV que son 68 a 84 mM superiores a los valores que se obtienen *in vivo*. STERN *et al.* (1978) obtuvieron valores de producción de AGV totales *in vitro*, muy similares a los valores encontrados por varios autores (GRAY *et al.*, 1966, 1967; WELLER *et al.*, 1967; WILTROUT y SATTER, 1972) *in vivo*. MASFIELD *et al.* (1995), encontraron que la proporción de acétato era similar *in vitro* e *in vivo*. La proporción de propiónato fue más elevada en el rumen que en fermentadores pero la proporción de butirato era menor *in vivo*. Sin embargo,

HANNAH *et al.* (1986) encontraron que la proporción de propionato era similar *in vivo* e *in vitro*, pero el butirato era menor en los fermentadores. MIETTINEN y SETÄLÄ (1989) encontraron que el butirato era superior *in vitro* que en el rumen. HODGSON y THOMAS (1975) sugirieron que el cambio en el equilibrio entre el acetato y butirato y, por tanto, la variabilidad de los resultados encontrados se debe al cambio en las especies microbianas o a la alteración del metabolismo microbiano como resultado del cambio de flujo que tienen lugar en los fermentadores. Algunos autores (CZERKAWSKI, 1986; CARRO *et al.*, 1995) observaron que la producción de AGV individuales *in vitro*, muestra valores similares a los encontrados en el rumen del animal. Sin embargo, TEJIDO *et al.* (2002) encontraron que la concentración de los AGV era más elevada en el líquido ruminal de ovino que en el fluido del "RUSITEC" y lo han atribuido al bajo número de microorganismos presentes en el "RUSITEC". Los cambios importantes en la proporción de los AGV entre *in vitro* e *in vivo* pueden ser también inducidos por las diferencias en el pH, la velocidad de dilución y el tiempo de retención (CRAWFORD *et al.*, 1980a).

Respecto a la concentración de nitrógeno amoniacal, GAZZI *et al.* (1998) no obtuvieron diferencias significativas entre el rumen del animal y el fermentador. Sin embargo, MANSFIELD *et al.* (1995) encontraron que las concentraciones de N-NH₃ eran menores en los fermentadores que *in vivo*, pero no confirieron a estas diferencias una significación biológica. BACH *et al.* (1999) y TEJIDO *et al.* (2002) observaron los mismos resultados atribuyéndose a la pérdida de protozoos, o bien, a la menor degradación de la proteína que se produce en los sistemas *in vitro*. HANNAH *et al.* (1986) observaron concentraciones de amonio menores *in vivo* que en fermentadores. La concentración de amonio es el resultado de su utilización y liberación por los microorganismos ruminal. Por tanto, la ausencia de la absorción en los fermentadores y las posibles diferencias en el reciclado de N con respecto a las situaciones que se dan *in vivo*, hace de la medida del N-NH₃, un mal indicador comparativo entre la actividad proteolítica y de la degradación de la proteína en los sistemas *in vivo* e *in vitro*. SHRIVER *et al.* (1986) han indicado que el pH influye en la concentración de N-NH₃. El tiempo de retención del alimento (CRAWFORD *et al.*, 1980b) también afecta a los cambios en la producción de proteína microbiana y en la degradación de la proteína del alimento. La influencia de estos factores sobre la concentración de amonio hacen de este parámetro uno de los pocos elementos inestables en la medida de las características de la fermentación *in vitro* (MIETTINEN y SETÄLÄ, 1989).

El flujo de nitrógeno microbiano, como el porcentaje de los flujos de nitrógeno total y NH₃-N era más bajo en el rumen que en fermentadores (MANSFIELD *et al.* 1995)

atribuyéndose esta disminución al componente endógeno que deprime el N microbiano *in vivo*. Sin embargo, utilizando un factor de corrección para el nitrógeno endógeno (3,6 g de N/kg de flujo duodenal de MS) BRANDT *et al.* (1980), MANSFIELD *et al.* (1995) encontraron que el nitrógeno microbiano, expresado como el porcentaje del flujo de N total, se obtienen valores similares *in vivo* e *in vitro*. De una manera similar el N microbiano, expresado como el porcentaje de NNA, aumenta y roza la concentración *in vitro*, cuando se le aplica el factor de corrección de N endógeno (MANSFIELD *et al.* 1995). Esta información sugiere que los fermentadores pueden simular el flujo de N en el rumen, cuando se aplica un factor de corrección de N endógeno, *in vivo*. La eficiencia de síntesis microbiana era más elevada *in vitro* (MANSFIELD *et al.*, 1995; MIETTINEN y SETÄLÄ, 1989). La producción de las células bacterianas y la eficiencia de su crecimiento dependen de la velocidad de crecimiento de esas células así como de que se suplan sus requerimientos de mantenimiento (HESPELL y BRYANT, 1979). El pH (HOOVER *et al.*, 1984) la velocidad de dilución (CRAWFORD *et al.*, 1980b; HOOVER *et al.*, 1984), y el tiempo de retención del alimento (CRAWFORD *et al.*, 1980b) también tienen un efecto sobre la eficiencia de síntesis microbiana. HANNAH *et al.* (1986) observaron que la eficiencia de síntesis de proteína microbiana era más elevada *in vivo* que *in vitro*. Esto puede deberse al acúmulo de AGV que aumenta los requerimientos para el mantenimiento de la población microbiana, al desviar la energía de crecimiento hacia el mantenimiento del pH intracelular y la integridad de las células. STERN *et al.* (1978) encontraron que los valores de nitrógeno microbiano en los fermentadores de flujo continuo eran comparables a los que se han observado *in vivo* por BLACKBURN y HOBSON (1960).

A diferencia de lo que ocurre en los fermentadores, la estratificación extensiva del material sólido que tiene lugar en el rumen afecta al ambiente de la fermentación. Sin embargo, la eficiencia puede mejorarse en los fermentadores ya que pueden controlarse factores tales como el pH, el tiempo de retención de la dieta y la velocidad de dilución. Estas modulaciones evitan grandes fluctuaciones de pH y de la disponibilidad de nutrientes que pueden desacoplar el crecimiento de las células y la producción de ATP (HESPELL y BRYANT, 1979).

La diferencia más obvia en la ecología microbiana entre el rumen y el cultivo continuo es la disminución drástica de los protozoos que se produce en los vasos de fermentación, en particular de los Holotricos que desaparecen totalmente (HOOVER *et al.*, 1976a; CRAWFORD *et al.*, 1980a; HANNAH *et al.*, 1986; MANSFIELD *et al.* 1995). Los Holotricos son especialmente vulnerables debido a su tiempo de generación que es muy largo (WILLIAMS,

1986) y no pueden ser retenidos en las condiciones homogéneas del fermentador. Se han realizado muchos intentos para retener los protozoos en los fermentadores: disminución del suministro de sustrato (MERRY *et al.*, 1987; TEATHER y SAUER, 1988) o de la velocidad de agitación (HOOVER *et al.*, 1976a; BROUDISCOU *et al.*, 1997); utilización de un complejo artificial de matrices (HILLMAN *et al.*, 1991). Con una velocidad de dilución del sólido elevada (1 volumen/24 horas) los protozoos son lavados de los fermentadores (ABE y KUMENO, 1970; HOOVER *et al.*, 1976a; CRAWFORD *et al.*, 1980). CRAWFORD *et al.* (1980) consiguieron mantener relativamente estable el nivel de los protozoos con aproximadamente $1,0 \times 10^4$ de protozoos/ml, con una velocidad de dilución de 0,81 volúmenes del fermentador/día. ABE e IRIKI (1978) consiguieron mantener el nivel de protozoos del animal en el cultivo continuo, con una velocidad de dilución del sólido de 0,48 volúmenes/24 horas y con diálisis del medio de cultivo. CZERKAWSKI y BRECKENRIDGE (1977) observaron que el número de protozoos disminuye de $12,6 \times 10^4$ a $3,6 \times 10^4$ cuando la velocidad de dilución aumenta de 0,33 a 0,96 volúmenes/24 horas. BROUDISCOU *et al.* (1997), combinando varios factores físicos y nutricionales, concluyeron que la disminución de la velocidad de agitación de los fermentadores de solo 260 a 230 rpm permite mantener los protozoos en un sistema *in vitro*. La minimización de la agitación y el mantenimiento de la estratificación en el fermentador se presentan como aspectos prometedores para conseguir la retención de los protozoos (TEATHER y SAUER, 1988; FUCHIGAMI *et al.*, 1989).

La pérdida de protozoos en los fermentadores puede tener un papel muy importante en la discrepancia entre los resultados obtenidos en los fermentadores y en el rumen. Su eliminación del rumen incrementa la eficiencia de síntesis de proteína bacteriana y como consecuencia de ello, una mayor cantidad de proteína microbiana y flujo de proteína dietética (LENG y NOLAN, 1984; USHIDA y al., 1991). Ello es debido a dos factores: la actividad predativa de los protozoos sobre las bacterias (COLEMAN, 1988) y su retención selectiva (WELLER y PILGRIM, 1974; VIERA, 1986). Ambos factores incrementan el reciclado de nitrógeno en el rumen, cuya significación ha sido confirmada mediante estudios en animales defaunados (BIRD *et al.*, 1990). WILLIAMS y COLEMAN (1988) observaron que la digestibilidad de la materia orgánica en el rumen se reduce en ausencia de los protozoos debido a que éstos pueden contribuir hasta a un tercio de la digestión ruminal de los carbohidratos de la pared celular (DEMEYER, 1981; ORPIN, 1984). La mayoría de las bacterias ruminales pueden utilizar el $N-NH_3$ como fuente de nitrógeno, mientras que los protozoos dependen de la proteína dietética y bacteriana (VIERA, 1986;

WILLIAMS, 1986; WILLIAMS y WITHERS, 1991). Las especies de bacterias no identificadas aumentan en los fermentadores (SLYTER y PUTNAM, 1967). La proliferación de las especies de bacterias poco comunes puede deberse al ambiente de la fermentación que es posible que estas bacterias llenen el nicho ecológico dejado por los protozoos.

La concentración de las bacterias celulolíticas disminuye en los sistemas *in vitro* en comparación con la situación que tiene lugar *in vivo* (MANSFIELD *et al.*, 1995). FUCHIGAMI *et al.* (1989) ratificaron este hecho y lo atribuyeron a la velocidad de dilución del fermentador utilizada en este estudio, que es más rápida y evita el desarrollo de regiones donde podrían ser retenidas las bacterias celulolíticas. Sin embargo, ERFLE *et al.* (1982) y LEEDLE *et al.* (1982) encontraron que la concentración de las bacterias celulolíticas era similar *in vivo* e *in vitro*. GIZZI *et al.* (1998) no observaron diferencias significativas, en cuanto a las bacterias viables totales (celulolíticas, amilolíticas, proteolíticas y metanobacterias), entre los sistemas *in vitro* y los ensayos *in vivo*. Estos últimos autores observaron también que las variaciones diurnas de la población bacteriana en los sistemas *in vitro*, estaban en concordancia con los valores encontrados *in vivo* y con los previamente observados por (DEHORITY y ORPIN, 1988; LEEDLE y GREENING, 1988). El porcentaje de las bacterias que podrían ser supuestamente identificadas oscilan entre 52 y 68% del total de las cepas aisladas (SLYTER y PUTNAM, 1967).

Las bacterias aisladas de los fermentadores contienen menos materia orgánica y más nitrógeno y púrinas en comparación con las bacterias aisladas en el rumen. El bajo contenido en materia orgánica puede reflejar una menor deposición de polisacáridos bacterianos que se almacenan cuando se ralentiza la división celular de las bacterias (HESPELL y BRYANT, 1979). Las elevadas concentraciones de nitrógeno y púrinas de las bacterias aisladas en fermentadores indican un crecimiento rápido de las células debido a que estas células contienen más ribosomas para mantener una elevada síntesis de proteína bacteriana (VELDKAMP, 1976).

Una explicación alternativa a la diferencia en la composición bacteriana, encontrada *in vivo* e *in vitro*, podría ser el cambio en las cantidades relativas de las bacterias asociadas a partículas y de las asociadas a la fase líquida. El perfil de las bacterias procedentes de fermentadores es similar al de las bacterias asociadas a la fase líquida del rumen (MERRY and MCALLAN, 1983). Las bacterias asociadas a la fase líquida pueden predominar en el ambiente del fermentador debido a la agitación constante que se produce, al pequeño tamaño de las partículas de las dietas y a la falta de predación por los protozoos.

En cuanto a la población de hongos, MANSFIELD *et al.* (1995) encontraron que su concentración en el rumen y en fermentadores era similar. La presencia de especies de hongos en los sistemas de cultivo continuo implica que las condiciones que llevan a la desaparición de protozoos en estos sistemas no afectan a los hongos. HILLIARE y JOUANY (1989) demostraron que el desarrollo de hongos está favorecido en el sistema de cultivo semi-continuo "RUSITEC" y que estos microorganismos son capaces de aumentar la degradación de forrajes de baja calidad en un 30% cuando se suplementa con sulfato y se trata con álcalis.

Las tendencias recientes a minimizar las pruebas con animales ha conducido a un aumento del interés por el desarrollo y uso de modelos predictivos *in vitro*. Las técnicas descritas fueron capaces de reproducir el ambiente ruminal del animal en *in vitro* (GIZZI *et al.*, 1998) y, por lo tanto, parecen tener un valor notable para el entendimiento de las funciones del rumen. No obstante, las diferencias entre el rumen y los fermentadores pueden ser atribuidas a la falta de la capacidad de absorción, a la "defaunación" que se produce en los sistemas *in vitro* y a la contribución de la proteína endógena *in vivo*. El análisis de los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* indica que estos son similares en un 80% en los parámetros individuales evaluados (MANSFIELD *et al.*, 1995). Sin embargo, se requieren más comparaciones *in vitro-in vivo* y más ensayos en sistemas *in vitro* alimentados con diferentes dietas para establecer la potencialidad predictiva de estas técnicas y un modelo común óptimo para el estudio de la fermentación ruminal.

2.7. TÉCNICAS DE VALORACIÓN NUTRITIVA.

2.7.1. Degradación de la proteína del alimento en el fermentador.

La degradación de la proteína proporciona información sobre la cantidad de amonio, aminoácidos y ácidos grasos de cadena ramificada suministrados a los microorganismos y también de la cantidad de proteína no degradada, suministrada al duodeno. En numerosos estudios se ha comprobado que la degradabilidad de la proteína variaba entre alimentos e, incluso para un mismo alimento, por lo que la determinación de la degradabilidad de cualquier alimento es importante a la hora de incluirlo como ingrediente en una dieta para rumiantes.

La técnica de los sacos de nylon, aplicada *in situ*, ha sido ampliamente utilizada y sigue siendo todavía el método de referencia en muchos países. La razón estaría probablemente en que la degradabilidad es determinada en el rumen y, por lo tanto, desde el punto de vista

biológico, resulta más fiable que los métodos *in vitro*. No obstante, los métodos *in situ* requieren animales canulados en el rumen, por lo que no se puede considerar como método de rutina para la valoración nutritiva de los alimentos. También se han utilizado técnicas alternativas *in vitro* para estimar la contribución de la proteína del alimento al rumen: solubilidad en disoluciones tamponadas (MADSEN y HVELPLUND, 1985; LINDBERG, 1986), digestiones enzimáticas (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 1985; POOS-FLOYD *et al.*, 1985; MAHADEVEN *et al.*, 1987; ROE *et al.*, 1990; AUFRÈRE *et al.*, 1991; ASSOUMANI *et al.*, 1992; ANTONIEWICZ y KOSMALA, 1995; ABDELGADIR *et al.*, 1997), solubilidad en soluciones de detergentes (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 1982), enzimas extraídas del contenido ruminal (KOHN y ALLEN, 1995b), producción de gases (BRODERICK, 1987; BLÜMMEL y BECKER, 1997; BABA *et al.*, 2002) etc. Algunos autores incuban directamente los sacos de nylon en los fermentadores (CZERKAWSKI y BRECKENRIDGE, 1977; BRICE y MORRISON, 1983; CZERKAWSKI, 1984; MORRISON y BRICE, 1984; CARRO *et al.*, 1995). Esta última técnica proporciona una alternativa al elevado gasto que supone mantener animales canulados y a la gran cantidad de dieta que se necesita para hacer frente al desarrollo de ensayos prolongados.

Sin embargo, el uso de la técnica de los sacos de nylon no está libre de críticas, tanto si se lleva a cabo con animales como con fermentadores ya que hay factores que pueden inducir a errores como el tamaño de poro del tejido de nylon, o la contaminación microbiana del residuo no degradado. El tamaño de poro es un factor muy importante en la determinación de la cinética de degradación de la materia seca y del nitrógeno, en el rumen o en el fermentador. Los poros tienen una influencia directa en la entrada de los microorganismos responsables de la degradación del alimento en el saco y en la salida de partículas del alimento no degradado. Por lo tanto, la degradación del nitrógeno dietético aumenta con el tamaño de poro de las bolsas de nylon (WEAKLEY *et al.*, 1983; LINDBERG *et al.*, 1984; CARRO *et al.*, 1995). Brice y Morrison, incubando en fermentadores de tipo "RUSITEC", sacos con distintos tamaños de poro (5, 24, 56 y 1000 μm), observaron una disminución significativa en la degradación de la materia seca del alimento incubado en los sacos de tamaño de 5 μm de poro. Con fermentadores de flujo semi-continuo, BOUILLER-OUUDOT *et al.* (1988a, b) observaron una disminución en la desaparición de la materia seca, nitrógeno y AGV totales de la paja cuando el tamaño de poro del saco disminuía de 250 a 25 μm . Un problema frecuente, relacionado con el tamaño de poro de los sacos, afecta a alimentos que contienen una parte importante de material no soluble en agua que puede abandonar los poros del saco y estimarse como degradada, cuando en realidad representa

sólo una pérdida de partículas (LINDBERG y KNUTSSON, 1981; JOUANY *et al.*, 1986; MADSEN *et al.*, 1995). Algunos autores (BOUILLER-OU DOT *et al.*, 1988a, b; BLANCHART *et al.*, 1989) han observado, en fermentadores, que el uso de sacos con de poros inferiores a 45 μm puede provocar retención de la muestra incubada y una reducción en la solubilización y la degradación del alimento e, incluso, en algunos casos llegar a inhibir la salida de los productos finales de la degradación. El tamaño de poro de los sacos debería ser suficientemente amplio, como para que los microorganismos circulen libremente a través de las bolsas y evitar el colapso de los poros por los componentes del alimento. También debería ser suficientemente pequeño como para evitar las pérdidas de las partículas no degradadas del alimento. Actualmente, el tamaño de poro de los sacos utilizados en los fermentadores está entre 50 y 150 μm (BLANCHART *et al.*, 1989). La elección del tamaño de poro ha de adaptarse al objetivo de cada trabajo y está condicionada por el proceso sufrido por la muestra y, particularmente, por la finura de molienda que se lleva a cabo para homogeneizar las muestras (MEHREZ y ØRSKOV, 1977). Otro problema asociado con el tamaño de poro de los sacos de nylon, es el relativo a los péptidos solubles que abandonan las bolsas de nylon y pueden no ser completamente degradados, como demostraron CHEN *et al.* (1987) *in situ*.

La contaminación microbiana de los residuos que permanecen en el saco después de su incubación puede ser importante, especialmente con alimentos fibrosos y muy pobres en nitrógeno, mientras que es de menor importancia para los concentrados (LINDBERG, 1985; VARVIKKO y LINDBERG, 1985). En un intento de reducir este problema se han utilizado varios tratamientos para desligar los microorganismos asociados a las partículas del residuo no degradado: surfactantes o sales en asociación con el frío (MINOTO *et al.*, 1966; DEHORITY y GRUBB, 1980; CRAIG *et al.*, 1987a), tratamientos mecánicos (MERRY y McALLAN, 1983; LEGAY-CARMIER y BAUCHART, 1989; MICHALET-DOREAU y OULD-BAH, 1992; WEISBJERG y HVELPLUND, 1993).

Desde la introducción de los Nuevos Sistemas de Valoración Proteica de Alimentos para Rumiantes, se han aplicado los valores de la degradabilidad de la proteína bruta (nitrógeno x 6,25) a la degradabilidad de los aminoácidos. Esta suposición es probablemente adecuada cuando el nitrógeno no proteico representa sólo una pequeña proporción de la proteína bruta, como es el caso de los concentrados, pero es cuestionable en el caso de los forrajes, en los que el nitrógeno aminoacídico sólo representa la mitad o dos tercios del nitrógeno total (SKIBA *et al.*, 1996). MARTÍN GARCÍA (2001), incubando subproductos del olivar en el rumen de ovino y caprino, observó que la degradabilidad de

la proteína es significativamente diferente de la de sus aminoácidos y que la de estos es diferente entre si, como se ha mostrado también en otros experimentos *in situ* (CHALUPA, 1976; SKÓVKO SAJKO *et al.*, 1994; WEISBJERG *et al.*, 1996b) e *in vitro* (CHALUPA, 1976).

BLANCHART *et al.* (1989) compararon la tasa de degradación del nitrógeno de 23 alimentos, incubados durante 48 horas *in situ* y en fermentadores, y observaron resultados similares, salvo para la pulpa de remolacha, maíz deshidratado y subproductos de la industria del vino cuya degradación conduce a cantidades de amonio inferiores a 1 mg/100 ml. Estos alimentos han presentado una degradación de proteína menor en los fermentadores de "RUSITEC" que *in situ*. La cinética de degradación del nitrógeno de 11 alimentos se ha determinado in "RUSITEC" e *in situ* (BLANCHART *et al.*, 1989) y parece que no hay gran diferencia entre los dos métodos (*in situ* vs fermentadores) en cuanto a la degradación del nitrógeno para periodos cortos (2 ó 4 horas) o largos (48 horas) (BLANCHART *et al.*, 1989). Sin embargo, para periodos intermedios, la diferencia entre los resultados que proporcionan ambos métodos parece aumentar. Para la degradación de proteína en periodos cortos o largos, la similitud en los resultados *in situ* y en los fermentadores, podría deberse a las características propias del alimento (la solubilidad, el complejo entre proteína y lignina o polisacáridos), mientras que la velocidad de degradación de la fracción potencialmente degradable del nitrógeno depende, sobre todo, de la actividad de los microorganismos. En los sistemas *in vitro*, el suministro de alimento una sola vez al día no favorece la fermentación entre las 4 y 24 horas de incubación, mientras que el animal puede tomar de nuevo alimento y así activar la capacidad fermentativa de sus microorganismos.

2.7.2. Síntesis de proteína microbiana en fermentadores.

La cuantificación de la producción de proteína microbiana en el rumen y de su contribución a las necesidades de los animales rumiantes es fundamental en la aplicación de los nuevos sistemas de racionamiento, basados en el aporte de proteína digestible al duodeno (WEBSTER, 1987). La proteína microbiana constituye, generalmente, una porción considerable del flujo duodenal de nitrógeno aminoacídico en los animales rumiantes. Así, se calcula que cuando los animales reciben raciones convencionales, la proteína microbiana representa entre el 40 y el 90% de los aminoácidos que llegan al intestino delgado (SCHNIFFEN y ROBINSON, 1987), aunque en ocasiones puede alcanzar el 100% (AFRC, 1992; STERN *et al.*, 1994). La razón de esta discrepancia no está clara, pero podría atribuirse a factores tanto nutricionales como analíticos (RANILLA *et al.*, 2001). En general, para la

cuantificación de la proteína microbiana se utilizan animales provistos de canulas en el rumen y el duodeno, por lo que esta técnica no puede ser considerada como de rutina.

Las dificultades técnicas que implica la determinación de este parámetro *in vivo* ha derivado el interés hacia el estudio de las potencialidades que representan, en este sentido, otras metodologías como las técnicas de simulación *in vitro* (CZERKAWSKI y BRECKENRIDGE, 1977, 1979; SCHAETZEL y JONSON, 1981; HANNAH *et al.*, 1986; KOMISARCZUK *et al.*, 1987b; CALSAMIGLIA *et al.* 1996; MOLINA ALCAIDE *et al.*, 1996; RANILLA *et al.*, 2001; CARRO y MILLER, 2002; Ranilla y Carro, 2003).

La cuantificación de la proteína microbiana, incluso mediante técnicas *in vitro*, requiere del empleo de marcadores microbianos (SCHÖNHUSEN *et al.*, 1995).

2.7.2.1. Marcadores microbianos.

Los marcadores microbianos son componentes específicos de la microbiota ruminal. Se distinguen 2 grandes grupos: marcadores internos que son constituyentes de las células microbianas y, por ello, no necesitan ser administrados a los animales o a los fermentadores: ácidos nucleicos -ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN)-, bases púricas, ácido diaminopimélico (DAPA), D-alanina, ácido aminoetilfosfónico (AEP), perfiles de aminoácidos y ATP. Los marcadores externos han de ser administrados a los fermentadores o a los animales para que sean incorporados por los microorganismos ruminales y formen parte de sus estructuras. Entre ellos se encuentran ^{15}N , ^{35}S y ^{32}P .

Las condiciones ideales de una sustancia marcadora de los microorganismos deberían ser según BRODERICK y MERCHEN (1992) las siguientes : i) 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. DEHORITY (1995), añade otros 3 requisitos: v) no ser absorbido en el tracto digestivo; vi) formar parte de los microorganismos ruminales en todas las fases de su crecimiento en una proporción constante y vii) que todas sus formas (libres o formando parte de células intactas de microorganismos ruminales o de alguna de sus partes) presenten el mismo ritmo de tránsito a través del tracto digestivo. Sin embargo, ninguno de los marcadores que se utilizan hasta el momento cumplen todos los requisitos señalados anteriormente (BRODERICK y MERCHEN, 1992; OBISPO y DEHORITY, 1999). La elección de un marcador, para llevar a cabo estudios sobre la síntesis de proteína microbiana ruminal, resulta especialmente complicada.

Actualmente, los dos marcadores microbianos más comúnmente utilizados para diferenciar la proteína microbiana de la proteína dietética son el DAPA (CZERKAWSKI, 1974) y las purinas (ZINN y OWEN, 1986).

2.7.2.1.1. Ácido diaminopimélico (DAPA).

El DAPA es un aminoácido que forma parte de la pared celular de numerosas bacterias ruminales. Fue aislado por primera vez en *Corynebacterium diphtheriae* (WORK, 1950) como constituyente de los mucopéptidos de su pared bacteriana. Se utilizó por primera vez como marcador microbiano por SYNGE (1950) y WELLER *et al.* (1958) lo emplearon para estimar la síntesis de proteína microbiana.

La utilización de DAPA como marcador microbiano presenta ventajas ya que se encuentra únicamente en la pared celular de numerosas bacterias (WORK, 1950; WORK y DEWEY, 1953) y está ausente en el material vegetal (SYNGE, 1953). La relación DAPA:N de las bacterias ruminales es relativamente constante (CZERKAWSKI, 1974). Por todo ello, se considera al DAPA como un marcador satisfactorio para las bacterias ruminales (LING y BUTTERY, 1978) siendo el marcador interno más comúnmente utilizado, junto a las purinas, para la estimación de la síntesis de proteína bacteriana ruminal tanto *in vitro* como *in vivo*.

El DAPA se ha empleado en diversos estudios, a pesar de que presenta numerosos inconvenientes. El hecho de que el DAPA se encuentre únicamente en la pared celular de las bacterias hace que la relación DAPA:N varíe entre especies bacterianas, dependiendo de las condiciones que alteran el tamaño celular. Las condiciones que favorecen el crecimiento de las bacterias de mayor tamaño provocan una disminución de la relación DAPA:N ya que la relación pared celular/protoplasma será proporcionalmente menor cuanto mayor sea el tamaño de las bacterias (BRODERICK y MERCHEN, 1992). Las bacterias de menor tamaño presentan sin embargo, una proporción DAPA:N superior. Además, algunas bacterias como las gram positivas no contienen DAPA en sus paredes celulares (WORK y DEWEY, 1953; MERRY y MCALLAN, 1983).

Por otra parte, algunos estudios (CZERKAWSKI, 1974; LING y BUTTERY, 1978; COCKBURN y WILLIAMS, 1984; OLUBOBOKUN *et al.*, 1988) indican la presencia de DAPA en protozoos. Ello puede deberse al método utilizado para aislar la fracción protozoaria y al hecho de que los protozoos ingieren bacterias (COLEMAN, 1975; STERN *et al.*, 1977a, b; COLEMAN, 1988). La relación DAPA/N en los protozoos es muy inferior a la que se encuentra en bacterias (CZERKAWSKI, 1974; RAHNEMA y THEURER, 1986; ROBINSON *et al.*, 1986). Este marcador no está distribuido de una forma homogénea en todos los

microorganismos ruminales. Por lo tanto, su uso puede conducir a la subestimación de la producción de N microbiano.

Por otra parte, GÓMEZ *et al.* (1991) indicaron que la lisis microbiana que tiene lugar en el rumen y la consiguiente pérdida del contenido celular conduce a un exceso en la concentración de paredes celulares microbianas en la digesta duodenal. Esto contribuye a un aumento en la relación DAPA/N microbiana en el duodeno, lo que implica una sobreestimación de la producción de nitrógeno microbiano. Resultados obtenidos *in vitro* (ONODERA *et al.*, 1974; ONODERA y KANDATSU, 1974; DENHOLM y LING, 1989) han demostrado el metabolismo de DAPA por los microorganismos ruminales. Por ello, la presencia de DAPA en la digesta duodenal no incluye sólo DAPA de las paredes celulares de las bacterias intactas, sino también DAPA de los fragmentos de las paredes celulares, de los peptidos y DAPA en forma libre, de tal manera que en algunos estudios se han obtenido proporciones de nitrógeno microbiano en la digesta duodenal superiores al 100% (NIKOLIC y JOVANOVIC, 1973). También se han identificado algunas bacterias mutantes que concentran DAPA (KASE *et al.*, 1970). La acumulación de estas especies podría modificar la relación DAPA-N: N de las muestras aisladas.

Otro punto crítico para la utilización de DAPA como marcador microbiano es su presencia en los alimentos de uso habitual en las dietas de los rumiantes (CZERKAWSKI, 1974; VARVIKKO y LINDBERG, 1985; RAHNIMA y THEURER, 1986; ZELAYA, 1994), apreciándose como la concentración de DAPA varía entre el 10 y el 50% de las concentraciones obtenidas en las bacterias ruminales. IBRAHIM *et al.* (1970) pudieron detectar trazas en los alimentos que utilizaron y lo atribuyeron a una posible contaminación microbiana.

STOKES *et al.* (1991a), en estudios con los fermentadores de flujo continuo observaron que la dieta puede alterar la composición química de la población microbiana ruminal cambiando la proporción de las especies presentes. NAGARAJA *et al.* (1978) observaron que la proporción de las especies de bacterias gram-positivas era más elevada en rumiantes que recibían dietas forrajeras que en aquellos que recibían concentrado y que las bacterias gram-positivas contienen menos nitrógeno que las gram-negativas (ARAMBEL *et al.* 1982) y no contienen DAPA (WORK y DEWEY, 1953). En algunos estudios (LING y BUTTERY, 1978; OLUBOBOKUN y CRAIG, 1990) se ha observado que la cantidad de DAPA presente en los microorganismos ruminales varía en función del tiempo transcurrido desde la ingestión del alimento.

Estas críticas son aplicables a todos los sistemas de marcadores microbianos.

Las suposiciones inherentes al uso adecuado de DAPA como marcador de N bacteriano son las siguientes: que este aminoácido está ausente de otros componentes nitrogenados en el fermentador o en el rumen; que la relación DAPA/N, determinada para las muestras de bacterias ruminales, es realmente representativa de la población microbiana ruminal y que las bacterias aisladas no estén contaminadas con residuos de partículas del alimento. En cualquier caso, el uso de DAPA es largo y laborioso, y se requiere de una mayor información que permita una utilización óptima de este marcador.

2.7.2.1.2. Ácidos nucleicos.

La utilización de estas sustancias como marcadores microbianos se basa en las altas concentraciones presentes en los organismos unicelulares (BRODERICK y MERCHEN, 1982). Su activa degradación en el rumen ha estimulado la utilización del flujo duodenal de estos compuestos como marcadores de la cantidad de proteína microbiana que llega al duodeno. Se han utilizado como marcadores microbianos el total de ácidos nucleicos (ZINN y OWENS, 1982; USHIDA *et al.*, 1985; ZINN y OWENS, 1986), el ADN (ARAMBEL *et al.*, 1982) y el ARN (SMITH y MCALLAN, 1970; LING y BUTTERY, 1978; MERRY y MCALLAN, 1983; SCHÖNHUSEN *et al.*, 1995), aunque en los últimos años la utilización de las púrinas ha adquirido un mayor protagonismo en estudios *in vitro* (CALSAMIGLIA *et al.*, 1996; KARUNANANDAA *et al.*, 1996; CARRO y MILLER, 1999a; CARRO y MILLER, 2002; Ranilla y Carro, 2003) e *in vivo* (PÉREZ *et al.*, 1996a; 1997b; MARTÍN-ORÚE *et al.*, 2000).

SMITH y MCALLAN (1970) usaron la relación ARN:N total en el líquido ruminal y en los microorganismos para estimar la cantidad de nitrógeno dietético que se transformaba en nitrógeno bacteriano y protozoario. Sin embargo, el procedimiento analítico (MCALLAN y SMITH, 1969) utilizado para aislar y cuantificar el ARN es laborioso. Su uso implica la suposición de que casi todo el ARN dietético es degradado en el rumen (MCALLAN y SMITH, 1973a). BUTTERY y COLE (1977) han expresado dudas acerca de si realmente todo el ARN se degrada en el rumen y sugieren que el flujo de proteína microbiana puede sobreestimarse, problema que incluso puede ampliarse, cuando la proteína dietética y los ácidos nucleicos son insolubilizados por exposición al calor o por tratamientos químicos. Por otra parte, la presencia de ribonucleasa durante la congelación y la descongelación de las muestras afecta directamente al análisis de polinucleótidos (SIDDONS *et al.*, 1982). Por ello, recientemente, se han puesto a punto otros métodos alternativos de aislamiento y cuantificación de los ácidos nucleicos, basados en la determinación de bases púricas aisladas bien por precipitación con nitrato de plata y posterior lectura espectrofotométrica de

absorción tras su solubilización, tomando como referencia ARN (equivalente ARN), o bien por cromatografía de alta resolución.

Las principales ventajas del uso de las purinas como marcadores microbianos es que su análisis por el método de ZINN y OWENS (1986) resulte simple, rápido y barato. El método consiste en hidrolizar las purinas mediante su tratamiento con una solución de ácido perclórico y precipitación de las mismas con nitrato de plata y su cuantificación espectrofotométrica. Sin embargo, MAKKAR y BECKER (1999) observaron que la recuperación de purinas a partir de extractos bacterianos ruminales a los que se habían sido añadido celulosa, almidón y fibra neutro detergente era solamente del 50% cuando se usaba este método, y propusieron la utilización de la técnica descrita por BALCELLS *et al.* (1992) para obtener una recuperación de las purinas cercana al 100%, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La utilización de las purinas como marcador microbiano presenta también algunos inconvenientes. MCALLAN y SMITH (1973a) observaron que cuando se introducían ácidos nucleicos libres (ARN y ADN) en el rumen, éstos eran degradados rápidamente a nucleósidos y bases, las cuales eran posteriormente catabolizadas (MCALLAN y SMITH, 1973b). Sin embargo, la situación puede ser diferente en el caso de los ácidos nucleicos de los alimentos, que se encuentran protegidos por las estructuras 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, 1973a; SCHELLING y BRYERS, 1984) concluyen que el flujo duodenal de purinas de origen alimenticio es insignificante; otros (SMITH *et al.*, 1978; PÉREZ *et al.* 1997a) señalan que hasta un 30% 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 purinas como marcador. CALSAMIGLIA *et al.* (1996) determinaron la degradación de las purinas de ocho dietas diferentes en fermentadores de doble flujo continuo y observaron que la degradación microbiana del nitrógeno de las purinas del alimento oscilaba entre 81 y 110% del N de purinas ingerido.

La relación purinas/N no es la misma en bacterias y protozoos e, incluso, varía en las diferentes especies bacterianas. Los protozoos que pasan al duodeno suelen presentar valores para la relación purinas/N próximos al 50% de los que presentan las bacterias (LING y BUTTERY, 1978; ROBINSON *et al.*, 1996). Por lo tanto, la síntesis microbiana se subestima cuando se utilizan extractos bacterianos como muestra de referencia. No obstante, la cuantificación de la proteína protozoaria presenta una gran dificultad, derivada

del hecho de que los protozoos suelen ser retenidos en el rumen debido a su adhesión a las partículas de alimento (BRODERICK y MERCHEN, 1992). Además, son escasos los estudios en los que se ha determinado su contribución al flujo de N duodenal.

En cuanto a la validez de un determinado marcador (DAPA, AEP, ³⁵S, RNA, ADN, BP, etc.), se han realizado numerosos estudios comparativos (SIDDONS *et al.*, 1982; LING y BUTTERY, 1987; CALSAMIGLIA *et al.* 1996; PÉREZ *et al.*, 1996; CARRO y MILLER, 2002; RANILLA y CARRO, 2003). Aunque estos estudios son interesantes no se pueden utilizar para determinar la validez de un marcador microbiano frente a otro. La combinación adecuada de sencillez analítica, precisión, rapidez y precio debería tenerse en cuenta en la elección de marcador.

La determinación de la cantidad de nitrógeno de la dieta que pasa al intestino delgado y el cálculo del N microbiano como diferencia entre el NNA y el N no degradado del alimento (HVELPLUND y MADSEN, 1985) podría representar una alternativa a la estimación de la síntesis de proteína microbiana mediante marcadores.

2.7.2.2. Características de la microbiota en los fermentadores.

La población microbiana ruminal no constituye una masa microbiana uniforme sino que está organizada en un ecosistema complejo, constituido por diversas poblaciones: bacterias, protozoos y hongos, distribuidos en diferentes compartimentos de fermentación (CZERKAWSKY y CHENG, 1988). En las últimas décadas, varios autores (MOLINA *et al.*, 1996; CARRO y MILLER, 2002; RANILLA y CARRO, 2003) han intentado muestrear *in vitro* la población microbiana ruminal directamente en el contenido del fermentador. El muestreo del contenido del fermentador o del rumen y la separación de la fracción bacteriana constituye uno de los aspectos más difíciles en la investigación de los microorganismos ruminales. En general, estos microorganismos se obtienen por centrifugación diferencial del líquido procedente de la filtración del contenido del fermentador o del efluente. El procedimiento de aislamiento del extracto microbiano se basa en una centrifugación a baja velocidad, en la cual se pretende la separación de las partículas. Los protozoos, las bacterias de elevado tamaño, los acúmulos bacterianos y las bacterias fuertemente ligadas a partículas (WELLER *et al.*, 1958) se pierden en esta etapa de la centrifugación. Respecto a la centrifugación a baja velocidad se han utilizado diferentes intensidades de centrifugación y tiempos: 150 x g, 20' (HSU y FAHEY, 1990; MANSFIELD *et al.*, 1994); 200 x g, 5' (SMITH y MCALLAN, 1974); 500 x g, 5' (MARTÍN-ORÚE *et al.*, 2000); 500 x g, 10' (CALSAMIGLIA *et al.*, 1996); 500 x g, 20' (CECAVA *et al.*, 1990); 650 x g, 20' (OLUBOBOKUN *et al.*, 1988); 800 x g,

8' (MOLINA ALCAIDE *et al.*, 1996); 1000 x g, 10' (HUSSEIN *et al.*, 1991; MARTIN *et al.*, 1996; AHVENJÄRVI *et al.*, 2002; KORHONEN *et al.*, 2002); 1200 x g, 4' (STORM y ØRSKOV, 1983).

Después de la primera centrifugación, se utiliza una segunda, de alta velocidad. También se han empleado diferentes intensidades de centrifugación y tiempos: 4640 x g, 30' (HSU y FAHEY, 1990; MANSFIELD *et al.*, 1994); 8000 x g, 20' (CECAVA *et al.*, 1990); 10000 x g, 15' (CALSAMIGLIA *et al.*, 1996); 10000 x g, 30' (AHVENJÄRVI *et al.*, 2002; KORHONEN *et al.*, 2002); 15000 x g, 20' (MARTIN *et al.*, 1996); 19500 x g, 8' (STORM y ØRSKOV, 1983); 20000 x g, 20' (HUSSEIN *et al.*, 1991; MARTÍN-ORÚE *et al.*, 2000); 25000 x g, 30' (OLUBOBOKUN *et al.*, 1988); 30000 x g, 15' (SMITH y McALLAN, 1974); 30000 x g, 20' (HA y KENNELLY, 1984); 47800 x g, 8' (MOLINA ALCAIDE *et al.*, 1996). La velocidad de centrifugación puede modificar la composición de la fracción bacteriana aislada (HSU y FAHEY, 1990). El extracto microbiano obtenido puede representar sólo una parte del contenido total de las bacterias ruminales y puede tener menor actividad metabólica que el total de las bacterias asociadas a las partículas del alimento (SMITH, 1975).

FORSBERG y LAM (1977) y CRAIG *et al.* (1987a) demostraron que las bacterias asociadas a la fase sólida (BAS) son predominantes en el contenido ruminal. Las bacterias ligadas a las partículas contribuyen en un 75% a la cantidad total del flujo duodenal (CRAIG *et al.*, 1987b). KOMISARCZUK *et al.* (1987a), *in vitro*, encontraron que las BAS representan un 30% de la población microbiana total. Las especies bacterianas (MINOTO *et al.*, 1990) y su composición química (MERRY y McALLAN, 1983; CARRO y MILLER, 2002) son muy diferentes en las BAS y en las asociadas a la fase líquida del rumen o del fermentador (BAL).

La falta de representatividad de los extractos extraídos de la fase líquida así como las diferencias que existen entre las poblaciones microbianas han justificado la variedad de tratamientos que se utilizan para separar y muestrear las fracciones bacterianas, asociadas al material sólido de la digesta. En este sentido, se han utilizado métodos fisico-químicos y mecánicos: agitación y homogenización (WARNER, 1962; DEHORITY y GRUBB, 1980; MERRY y McALLAN, 1983; MARTÍN-ORÚE *et al.*, 1998); tratamientos químicos (MINATO y SUTO, 1981; MARTÍN-ORÚE *et al.*, 1998; RANILLA y CARRO, 2003); tratamientos térmicos (OLUBOBOKUN *et al.*, 1988; BATES *et al.*, 1985); o incluso combinaciones de todos estos tratamientos (WHITEHOUSE *et al.*, 1994; MARTÍN-ORÚE *et al.*, 1998).

Los microorganismos ruminales están asociados de distintas formas al material sólido en el fermentador (CZERKAWSKI y BRECKENRIDGE, 1977; 1985; WALLACE *et al.*, 1980). Un protocolo ideal para la disociación de todos los microorganismos adherentes requiere la

combinación de varios métodos para desligar los microorganismos, sin modificar sustancialmente la integridad de los extractos microbianos. No obstante, los niveles de desligamiento no son constantes ni independientes del tratamiento experimental (OLUBOBOKUN *et al.*, 1988; CRAIG *et al.*, 1987a). Los valores obtenidos por CRAIG *et al.* (1987a) oscilaban entre 32 y 52%. OLUBOBOKUN *et al.* (1988) obtuvieron un valor que oscilaba entre 33 y 54%, en microorganismos asociados a las partículas (BAS). MARTÍN-ORÚE *et al.* (1998) han conseguido desligar hasta un 60% de BAS. WHITEHOUSE *et al.* (1994) consiguieron desligar hasta 83% del "pellet" bacteriano cuando adicionan metilcelulosa (0,1%) a "tween 80" y metanol. RANILLA *et al.* (2001) han utilizado procedimientos que permiten desligar aproximadamente un 80% de las BAS. Ranilla y Carro (2003) combinando entre la solución de metilcelulosa y "tween 80" consiguieron desligar hasta un 89% de bacterias asociadas a partículas.

Los niveles de recuperación del material microbiano adherido a las partículas de la dieta son, en general, bajos. No obstante, los propios métodos de desligamiento pueden producir lesiones en las células, como puede ser el caso de alcoholes. Si estos no se usan de una manera moderada, reaccionan con la estructura lipídica de la membrana celular, rompiendo la unión no covalente en la región hidrofóbica de lípidos (HAROLD, 1970) y pueden causar lesiones celulares en bacterias adheridas y libres y, por lo tanto, la pérdida del contenido celular. El "pellet" bacteriano podría ser alterado por la alteración de la proporcionalidad entre la pared celular y el contenido citoplásmico. FLETCHER (1983) observó una disminución en el desligado de las bacterias cuando la concentración de butanol aumentaba de 0,2 a 2%. WHITEHOUSE *et al.* (1994) confirmaron estos resultados.

La composición química de ambas fracciones bacterianas (BAS y BAL) es diferente (MERRY y McALLAN, 1983; BAUCHART *et al.* 1986; LEGAY-CARMIER y BAUCHART, 1989). La concentración de MO es más elevada en BAS que en BAL (MARTIN *et al.* 1994; RODRÍGUEZ *et al.* 2000). Esta diferencia podría explicarse por la mayor concentración de lípidos observada en las BAS, en comparación con las BAL (MERRY y McALLAN, 1983; LEGAY-CARMIER y BAUCHART, 1989; RODRÍGUEZ *et al.* 2000). Es posible que la elevada concentración de lípidos en BAS esté relacionada con una disminución de bacterias gram-positivas, dado que la concentración de lípidos en la pared celular de estas es más baja que en las gram-negativas (CUMMINS, 1989).

Las diferencias en la composición aminoácidica entre las dos poblaciones microbianas reflejan la presencia de diferentes especies en BAS y BAL. La elevada concentración de alanina en las BAL puede reflejar una elevada proporción de especies gram-positivas. D-

alanina y L-alanina son los principales aminoácidos del tetra-peptido que constituye el peptidoglicano de la pared celular de las bacterias, y este representa una gran porción (50% o más) de la pared celular de las bacterias gram-positivas, mientras que en las bacterias gram-negativas suele ser menor del 10% de sus paredes y, a veces, representa solamente un 1% (CUMMINS, 1989). El DAPA también es un aminoácido abundante en el tetra-peptido y su concentración es más elevada en BAL que en BAS (MERRY y MCALLAN, 1983; FIRKINS *et al.* 1987; LEGAY-CARMIER y BAUCHART, 1989; MARTIN *et al.* 1994). La relación DAPA:N es significativamente menor en BAS que en BAL (MERRY y MCALLAN, 1983; LEGAY-CARMIER y BAUCHART, 1989; MARTIN *et al.*, 1994).

La variación en la composición aminoacídica de las bacterias en relación con la dieta ingerida, podría ser el resultado del cambio en la composición de las especies de la flora ruminal (YANG *et al.*, 2001; STOKES *et al.*, 1991b) y, también de la variación en el estado fisiológico de las células asociada con el cambio en el crecimiento y la velocidad del movimiento, que pueden alterar la relación pared celular:protoplasma y, por tanto, la proporción de algunos aminoácidos.

Se ha observado que BAS presentan un menor contenido en purinas (o en ARN y ADN) y una menor relación purinas:N, tanto en estudios *in vivo* (MERRY y MCALLAN, 1983; OLUBOBOKUN *et al.* 1988; LEGAY-CARMIER y BAUCHART, 1989; CECAVA *et al.* 1990; PÉREZ *et al.*, 1996b, 1997b, 1998a; MARTÍN-ORÚE *et al.*, 1998; MARTÍN-ORÚE *et al.* 2000), como *in vitro* (CARRO y MILLER, 2002). Estas diferencias, en el contenido en purinas, parecen deberse a las características intrínsecas de las diferentes especies que integran cada fracción bacteriana y al menor ritmo de crecimiento de las BAS en comparación con las BAL (BATES *et al.*, 1985; LEGAY-CARMIER *et al.*, 1989). Se ha observado también que la relación $^{15}\text{N}:\text{N}$ era menor en BAS que en BAL (KOMISARCZUK *et al.* 1987a; CECAVA *et al.* 1990; OLUBOBOKUN *et al.* 1990; MARTIN *et al.* 1994; BECKERS *et al.* 1995; RODRÍGUEZ *et al.* 2000). Esta diferencia indica que las BAS utilizan menos N-NH_3 y prefieren nitrógeno derivado de la degradación de las partículas del alimento que colonizan. KOMISARCZUK *et al.* (1987a), en fermentadores de flujo semi-continuo, observaron una incorporación de aminoácidos y oligopéptidos más elevada por BAS que por BAL. No obstante, este efecto puede deberse a la dificultad de difusión del N-NH_3 en el micro-ambiente de las micro-colonia de bacterias BAS.

MOLINA ALCAIDE *et al.* (1996) aislaron las bacterias asociadas a la fase sólida (BAS) y líquida (BAL) del contenido de los fermentadores de flujo continuo y de sus efluentes (BE), analizaron sus contenidos en ácidos grasos de cadena larga y encontraron que el contenido

en ácidos grasos totales así como las diferencias entre las fracciones bacterianas eran similares a los resultados observados por HARFOOT y HAZLEWOOD (1988), BAUCHARD *et al.* (1990) y WEISBJERG *et al.* (1992). MOLINA ALCAIDE *et al.* (1996) compararon la composición en ácidos grasos totales de la dieta y de las bacterias aisladas de los fermentadores a los que se suministraban dicha dieta y encontraron que la mayor diferencia era la relativa a los ácidos grasos 16:0 y 18:0 que son índices de la capacidad de síntesis y saturación de los microorganismos ruminales, como han observado PATTON *et al.* (1970) *in vitro* y FERLAY *et al.* (1993) *in vivo*. La proporción de ácidos grasos 18:0 es más elevada en las BAS que en las BAL. Los ácidos grasos 16:0 son ligeramente superiores en la fracción de bacterias aisladas a partir de los efluentes. Los factores que controlan la síntesis y la desaparición de los ácidos grasos en el rumen no son bien conocidos. El contenido en nitrógeno dietético afecta a la composición en ácidos grasos de las bacterias ruminales (GERSON *et al.* 1983; HUSSEIN *et al.*, 1995).

Las diferencias entre las dos fracciones microbianas, asociadas a las fases líquida y sólida del contenido ruminal confirman la necesidad de considerar el aislamiento de una fracción de microorganismos que englobe ambas fracciones y no únicamente las bacterias asociadas al líquido.

Son muy pocos los estudios en los que se han intentado aislar un extracto bacteriano representativo (MOLINA *et al.*, 1996; CARRO y MILLER, 2002). Estos últimos autores aislaron un extracto bacteriano que incluía bacterias asociadas a las fases sólida y líquida de la digesta, obtenido de un fermentador semicontinuo "RUSITEC", y observaron que la relación purinas:N de dicho extracto presentaba un valor intermedio entre los encontrados en las BAL y las BAS. CECAVA *et al.* (1990) observaron que la relación purinas:N de un extracto microbiano "mixto", aislado de terneros, fue similar a la encontrada en las BAS aisladas de los mismos animales.

2.7.2.3. Factores que afectan a la síntesis de proteína microbiana.

La intensidad de síntesis de proteína microbiana varía tanto *in vivo* como *in vitro*. La variabilidad en esa intensidad puede ser atribuida al marcador utilizado. Sin embargo, los factores que probablemente inducen esas diferencias reales son: la concentración y la fuente de nitrógeno, la fuente de carbohidratos, la velocidad de dilución y el tiempo de retención del sólido en el fermentador, la fuente de grasas, las deficiencias en minerales (azufre, fósforo) y la frecuencia del suministro de la dieta al fermentador.

- Concentración de nitrógeno: Se requiere un suministro adecuado de nitrógeno para alcanzar una eficiencia máxima de síntesis de proteína microbiana ruminal. Si el nivel de nitrógeno no es adecuado, puede ocurrir un desacoplamiento entre la fermentación y la producción de ATP (MCMENIMAN *et al.*, 1976b; BUTTERY, 1977). Si el nitrógeno está en exceso, la energía puede ser un factor limitante para la eficiencia óptima de utilización del nitrógeno. Por lo tanto, para que haya una eficiencia máxima de crecimiento microbiano, la disponibilidad de nitrógeno y energía en el rumen o en el fermentador deben estar equilibradas. Puesto que el amoníaco es la principal fuente de nitrógeno para los microorganismos, en numerosos estudios se ha intentado definir su concentración óptima en el líquido ruminal o el aporte necesario de N degradable que permita un crecimiento óptimo de las poblaciones microbianas. En estudios *in vitro*, se ha demostrado que el crecimiento microbiano llega al máximo cuando la concentración de N-NH₃ varía de 5 a 8 mg/100 ml (ALLISÓN, 1970; SATTER y SLYTER, 1974; ANNISON, 1975; NIKOLIC *et al.*, 1975). HONGERHOLT *et al.* (1998) encontraron, en fermentadores de flujo continuo, que la síntesis de proteína microbiana llega a su máximo cuando la concentración de N-NH₃ era de 6 mg/100 ml. BLANCHART *et al.* (1989) obtuvieron una concentración amoniacal superior a 5 mg/100 ml en los fermentadores de flujo semi-continuo. HUME *et al.* (1970) observaron, *in vivo*, que el crecimiento microbiano llega a su nivel máximo cuando la concentración de N-NH₃ llega a los 9 mg/100 ml. Los niveles que garantizan la máxima actividad microbiana han sido estimados en un rango muy variable e, incluso, algunos autores llegan a hablar de rangos de valores entre 6 y 28 mg N-NH₃/100 ml (HESPELL, 1984). En cualquier caso, parece que los niveles mínimos de amoníaco para un óptimo crecimiento bacteriano no son constantes sino que dependen de diversos factores (fuente de energía disponible, velocidad de tránsito del alimento en el fermentador o en el rumen, tipo de la población microbiana, etc.).
- Fuente de nitrógeno: Aunque, la concentración de nitrógeno en la dieta pueda parecer adecuada para un máximo crecimiento microbiano, la resistencia de la proteína a la degradación microbiana ruminal puede provocar una deficiencia de nitrógeno. La velocidad y la extensión de la degradación de la proteína dependen de la actividad proteolítica de los microorganismos, del acceso de estos a la proteína y del tiempo de retención de esta en el fermentador (BLANCHART *et al.*, 1989) o en el rumen (NRC, 1985). La estructura de la proteína afecta al acceso de los enzimas proteolíticos.

Algunas proteínas de los alimentos son naturalmente resistentes a la degradación microbiana (proteínas de origen animal); sin embargo, otras pueden tener una elevada o baja resistencia dependiendo de su aspecto físico (proteínas de origen vegetal). La ingestión de dietas forrajeras puede dar lugar a una deficiencia del nitrógeno disponible para los microorganismos ruminales (HUME, 1975; ULYATT *et al.*, 1975; WALKER *et al.*, 1975) dependiendo de factores tales como la especie vegetal, su estado de madurez, desecación, etc. RUSSELL y SNIFFEN (1984) observaron *in vitro* que la sustitución de una fuente de nitrógeno no proteico, por proteína degradable en el rumen, aumenta la síntesis de proteína microbiana. CARRO y MILLER (1999b) y RANILLA *et al.* (2001) obtuvieron, en estudios realizados *in vitro*, un aumento en la eficiencia de síntesis microbiana cuando la flora ruminal dispone de aminoácidos preformados. MOLINA ALCAIDE *et al.* (1996), en fermentadores de flujo continuo, observaron que la adición de proteína de torta de girasol a una dieta a base de arbustos de baja calidad, aumentaba la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana. Sin embargo, la adición de urea a la misma dieta forrajera no parece tener efectos beneficiosos sobre la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana. GRISWOLD *et al.* (1996), *in vitro*, observaron que la síntesis de proteína microbiana aumentaba cuando la proteína de soja se sustituía por urea. KROPP *et al.* (1977a), en ensayos realizados *in vivo*, observaron el mismo fenómeno cuando se sustituyó por urea igual cantidad de nitrógeno de la harina de semilla de soja. La fuente de nitrógeno y la extensión de la degradación en el fermentador o en el rumen, juegan un papel importante en la síntesis de proteína microbiana.

- Fuente de carbohidratos: La utilización eficiente del nitrógeno dietético degradado requiere que la energía de la fermentación de la materia orgánica dietética se suministre a una velocidad que se acople con la capacidad sintética de los microorganismos ruminales (OLDHAM *et al.*, 1977). Los carbohidratos fácilmente disponibles como el almidón y los azúcares son más efectivos que otros carbohidratos para incrementar la utilización del nitrógeno dietético degradado y/o el crecimiento microbiano, de acuerdo con las observaciones realizadas por diversos autores en estudios realizados *in vitro* (ROBERTSON y HAWKE, 1965; STERN *et al.*, 1987; HUSSEIN *et al.*, 1991). MCALLAN y SMITH (1976a) observaron que la fermentación del almidón proporciona una gran cantidad de energía para las bacterias del rumen. La eficiencia del almidón para promover la utilización de nitrógeno puede estar relacionada con la producción de energía durante la fermentación. El principal

factor que afecta la utilización de nitrógeno dietético degradado en el rumen es el tipo y la velocidad de degradación de los carbohidratos disponibles. En ensilados se observa claramente la importancia de la sincronización entre la liberación de energía y la de la proteína. En este caso, se produce una reducción en la concentración de carbohidratos solubles y un incremento en el contenido de nitrógeno degradable (BEEVER, 1993). Por ello, la administración de este tipo de alimentos limita los niveles de eficiencia debido a la falta de sincronización entre la liberación de energía, que es muy lenta, y de nitrógeno, más rápida (SIDDONS et al., 1985). Ello implica que se produzca un incremento de la concentración de N-NH₃ en el rumen tras la ingestión del alimento mientras que la energía se hace disponible más tarde, cuando el amonio desciende a un nivel limitante. La extensión y la velocidad de degradación en el rumen de las fuentes de nitrógeno y carbohidratos determinan la eficiencia del crecimiento microbiano.

- Ritmo de dilución: Entre los factores que afectan a la síntesis de proteína microbiana se encuentran el ritmo de dilución y el tiempo de retención del sólido en el fermentador o en el rumen. En este sentido, se han llevado a cabo varios estudios realizados con fermentadores de flujo continuo (CRAWFORD et al. 1980a, b; HOOVER, 1982; HOOVER et al., 1984). En ellos se ha observado una correlación positiva entre el ritmo de dilución y el aumento del crecimiento microbiano (HOBSON, 1965; HOBSON y SUMMERS, 1967; STOUTHAMER y BETTENHAUSSEN, 1973; ISAACSON et al., 1975). CRAWFORD et al. (1980b) observaron que el flujo de nitrógeno microbiano, en los fermentadores de flujo continuo, aumentaba al hacerlo la velocidad de dilución pasando de 1,60 a 2,50 g/24 horas para velocidades de degradación de 0,07 y 0,15 volumen/hora, respectivamente. Sin embargo, el flujo del nitrógeno bacteriano disminuía al aumentar el tiempo de retención del sólido. HOOVER et al. (1982) observaron *in vitro* que el pH también es un factor muy importante en la producción de proteína microbiana y que, incluso llega a tener más influencia sobre la actividad microbiana que la velocidad de dilución. CHOW y RUSSELL (1992) observaron una disminución en la producción de las bacterias celulolíticas cuando el pH era bajo. KINNEDY et al. (1976) indicaron algunos factores implicados en la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana que se relacionan positivamente con la velocidad de dilución: reducción de la autólisis de las bacterias, reducción en la predación de las bacterias por los protozoos, cambios en la estructura de la población microbiana

inducidos por el cambio en el sustrato o, posiblemente, debidos al lavado de los microorganismos con un tiempo de generación lento.

- Fuente de grasas: la suplementación con grasas de las dietas para rumiantes ha aumentado en los últimos años, sobre todo en los animales de producción, debido a sus altas demandas en energía. La adición de la grasa a la dieta puede afectar al flujo ruminal de la proteína microbiana, alterando la cantidad de carbohidratos disponibles para los microorganismos, la fermentación de estos carbohidratos y, posiblemente, la cantidad de nitrógeno incorporado a la proteína microbiana por unidad de carbohidratos fermentados. Varios autores (DOREAU *et al.*, 1991, 1993; KLUSMEYER *et al.*, 1991; OHAJURUKA *et al.*, 1991; FERLAY *et al.*, 1992; PALMQUIST *et al.*, 1993) no han observado efectos en la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana, al variar las fuentes y las cantidades de grasas suministradas a las dietas. Por el contrario, otros autores (SUTTON *et al.*, 1983; JENKINS y PALMQUIST, 1984; JENKINS *et al.*, 1990; KLUSMEYER *et al.*, 1991) sí han observado un aumento en la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana. Estos atribuyeron ese aumento al efecto “defaunador” de la grasa, que deprime la predación de las bacterias por los protozoos, dando lugar a un aumento de la síntesis de proteína microbiana en el rumen (JENKINS y PALMQUIST, 1984). SCHUAFF y CLARCK (1992) no encontraron una alteración de la fermentación ruminal cuando la dieta se suplementaba con 3 y 6% de sales cálcicas de ácidos grasos de cadena larga (Ca-LCFA). Sin embargo, la suplementación de la dieta con 9% de Ca-LCFA altera la fermentación ruminal. PALMQUIST y KINSEY (1994) observaron que los ácidos grasos de cadena larga (> 20 átomos de carbono) presentes en el aceite de pescado no son biohidrogenados *in vitro*. Cuando se adiciona harina de pescado, que contiene 8 a 10% de grasa, a dietas pobres en forrajes, suministradas a fermentadores de flujo continuo, la síntesis de proteína microbiana y la eficiencia de la síntesis de proteína disminuían.
- Otros factores: En fermentadores de flujo semi-continuo varios autores han estudiado el efecto del fósforo (KOMISARCZUK, 1985; DURAD *et al.*, 1986a, b, c; KOMISARCZUK *et al.*, 1987b) y del azufre (DURAND *et al.*, 1986, 1987; STEVANI *et al.*, 1988) sobre la síntesis de proteína microbiana. Estos autores observaron un aumento en la degradación de las paredes celulares y, por tanto, un aumento de la producción de nitrógeno bacteriano, en los fermentadores suplementados con azufre o fósforo, en comparación con los que no habían sido suplementados. La posibilidad que ofrecen los fermentadores de estudiar por separado la producción de nitrógeno bacteriano de

las BAS y de las BAL, permite subrayar que la deficiencia en minerales reduce más la actividad de las BAL que la de las bacterias ligadas a partículas. Estas últimas utilizan preferentemente los minerales del sustrato vegetal. La disminución de la producción de proteína microbiana, observada en los fermentadores de flujo continuo, con una deficiencia de azufre (SLYTER y CHALUPA, 1986) ha sido también confirmada en "RUSITEC" (DURAND *et al.*, 1986) o *in vivo* (DURAND y KOMISARCZUK, 1988). El azufre es requerido por los microorganismos ruminales para la síntesis de metionina y cistina. Estudios llevado a cabo por HUME y BIRD (1970), *in vivo*, demostraron que la relación óptima para el crecimiento máximo de los microorganismos nitrógeno:azufre es de 10:1. Sin embargo, en los fermentadores el aporte de nitrógeno:azufre óptimo no está todavía establecido (BLANCHART *et al.*, 1989). KOMISARCZUK *et al.* (1987c) suplementando los fermentadores de flujo continuo con distintas cantidades de fósforo (48, 28, 4 y < 1 mg/l) observaron que la síntesis de proteína microbiana se mantenía en 0,48 g/día cuando los valores de fósforo eran superiores a 4 mg/l. Sin embargo, la producción de nitrógeno bacteriano disminuye hasta 0,26 g/día cuando la concentración de P es inferior a 1 mg/l. Estos últimos autores obtuvieron una relación óptima N:P de 6,5.

- La presencia de taninos también afecta a la síntesis de proteína microbiana (ver el apartado 2.3.2).

2.7.3. Digestibilidad en el intestino delgado de la proteína del alimento no degradada.

La digestibilidad intestinal de la proteína del alimento no degradada es una fracción importante en los Nuevos Sistemas de Valoración Proteica de Alimentos para Rumiantes ya que, permite determinar la magnitud de desaparición de la proteína y de los aminoácidos del alimento en el último tramo del tracto digestivo de los rumiantes. Se han utilizado varios métodos para la estimación de esta fracción (HVELPLUND, 1985; ANTONIEWICZ *et al.*, 1992; SUSMEL *et al.*, 1994; CALSAMIGLIA *et al.*, 1995).

No obstante, la información sobre la estimación de la digestibilidad verdadera en el intestino delgado de los rumiantes de los aminoácidos no degradados en rumen es escasa (SHWARING y KAUFMANN, 1978). HVELPLUND (1985) midió los incrementos que se producían, tanto en la proteína como en los aminoácidos que pasaban al íleon terminal cuando se infundían en el abomaso de ovejas diferentes proteínas, que habían sido previamente expuestas a una cierta degradación en el rumen. Este autor demostró que la proteína y los aminoácidos de diferentes proteínas no degradadas se digieren con grados

variables en el intestino delgado, especialmente en situaciones en que la proteína está protegida frente a la degradación ruminal. KAUFMANN y LÜPPING (1982) observaron que la protección afecta negativamente a la digestibilidad de la proteína no degradada en rumen.

La variabilidad en la digestibilidad de la proteína del alimento no degradada, indica que el parámetro no puede ser considerado como constante, sino que es necesario determinarlo en todos los alimentos. Los experimentos *in vivo* y el uso de las técnicas de infusión, para la estimación de la digestión post-ruminal de la proteína dietética no degradada, sólo pueden aplicarse a un número limitado de alimentos por su coste y el consumo de tiempo que implican. Por ello, se han aplicado diferentes métodos alternativos.

La técnica de los sacos de nylon móviles, que ha sido utilizada por varios autores (HVELPLUND, 1985; RAE y SMITHARD, 1985; VOIGT *et al.*, 1985; DEBOER *et al.*, 1987) parece prometedora para estimar la digestibilidad verdadera de la proteína dietética no degradada en el rumen. Este método es capaz de revelar diferencias en la desaparición del nitrógeno de los sacos durante su paso a través del intestino, cuando se emplean diferentes fuentes de proteína no degradada (HVELPLUND, 1985).

Aunque la técnica de los sacos móviles puede revelar diferencias esperadas en la desaparición de la proteína en el intestino delgado, es necesario proporcionar evidencia de una alta correlación entre la desaparición y la digestibilidad verdadera, si el método es utilizado como método de rutina. HVELPLUND (1985) demostró una relación significativa entre la desaparición del nitrógeno de los sacos móviles y su digestibilidad en el intestino delgado de ovino.

La técnica de los sacos móviles es mucho menos laboriosa que el método de infusión *in vivo* para la estimación de la digestibilidad verdadera (HVELPLUND, 1985). No obstante, no es conveniente usarla como método de rutina para la evaluación de todos los alimentos ya que, además de consumir tiempo, requiere disponer de animales fistulados en el rumen y en el intestino delgado proximal. Por ello, es importante desarrollar métodos *in vitro* que puedan predecir la digestibilidad de la proteína del alimento en el intestino con igual precisión. Se han utilizado diferentes aproximaciones que incluyen el uso de enzimas (ANTONIEWICZ *et al.*, 1992; CALSAMIGLIA y STERN, 1995) o del nitrógeno soluble en detergente ácido (GOERING *et al.*, 1972; KRISHNAMOORTHY *et al.*, 1982; KUSUMANTI *et al.*, 1996).

El nitrógeno insoluble en detergente ácido (NIDA) se ha propuesto como estimador de la fracción indigestible de la proteína no degradada en el rumen (WILSON y STRACHAN, 1980; LOERCH *et al.*, 1983) considerándose que el 90% de la proteína no degradada en el

rumen que no es NIDA, es digestible. En ensayos realizados por KUSUMANTI *et al.* (1996) se ha observado una relación muy pobre ($r = 0,30$) entre NIDA y la desaparición de nitrógeno de los sacos móviles. Por tanto, el método basado en el NIDA no parece satisfactorio para la estimación de la digestibilidad, si se acepta que la desaparición de la proteína de los sacos móviles es fisiológicamente razonable para estimar la digestibilidad verdadera *in vivo*, como demostraron HVELPLUND *et al.* (1994).

Entre los métodos *in vitro* que se utilizan, ANTONIEWICZ *et al.* (1992) desarrollaron una técnica enzimática de dos pasos, utilizando pepsina y pancreatina, y compararon los resultados obtenidos con los derivados de la aplicación de la metodología de los sacos móviles, con diferentes alimentos, obtuvieron una buena correlación entre los dos métodos. VAN STRAALLEN *et al.* (1993), utilizando el método de dos pasos *in vitro*, con diferentes forrajes observaron una digestibilidad más baja que con el método de los sacos móviles, pero obtuvieron una buena correlación entre ambos métodos.

CALSAMIGLIA y STERN (1995) desarrollaron un método de tres pasos. Este método incluye una fase de preincubación en el rumen del animal durante 16 horas, seguido de una incubación en soluciones enzimáticas (pepsina y pancreatina). Este procedimiento fue comparado con los resultados obtenidos *in vivo* para diferentes alimentos obteniéndose altas correlaciones (CALSAMIGLIA y STERN, 1997). Como técnica de rutina, este método tiene limitaciones ya que la preincubación del alimento en el rumen, que implica el acceso a animales canulados a nivel ruminal. Esta técnica tampoco ha sido contrastada con alimentos altamente fibrosos o que contengan polifenoles.

2.7.4. Sistema de Valoración Proteica de Alimentos para Rumiantes AAT-PBV.

Durante muchos años, el valor proteico de los alimentos para rumiantes ha sido expresado como proteína digestible o proteína bruta, pero esta medida no expresa la cantidad de aminoácidos absorbidos en el intestino y, por tanto, disponibles para el animal.

El sistema AAT-PBV fue desarrollado por grupos de investigadores de los países escandinavos (NKJ, 1985). Los conceptos básicos de este sistema fueron definidos por HVELPLUND (1982) y MADSEN (1982).

El término AAT se refiere a la cantidad de aminoácidos absorbidos en el intestino delgado o disponibles para el animal. Expresa el valor proteico del alimento para el animal y lo relaciona con sus requerimientos proteicos. El valor proteico del alimento para los microorganismos del rumen se expresa como balance proteico en el rumen (PBV). El cálculo directo de los valores AAT-PBV de todos los alimentos disponibles requiere de

animales canulados a varios niveles del tracto digestivo, lo que no es realista. Por lo tanto, se han desarrollado fórmulas que permiten calcular los valores AAT-PBV a partir de factores que son constantes o variables y, relacionados con las características de los alimentos. Para la estimación de los valores AAT-PBV, se requiere conocer el contenido en proteína bruta del alimento, la degradabilidad ruminal de esa proteína, la cantidad de proteína microbiana sintetizada en el rumen, la proporción de aminoácidos de la proteína del alimento no degradada en el rumen, la digestibilidad intestinal de estos aminoácidos, la proporción de aminoácidos en la proteína microbiana y su digestibilidad en el intestino delgado.

El sistema se desvía de otros sistemas propuestos en varios aspectos, entre los cuales destacan:

- El sistema AAT-PBV tiene un valor que expresa el suministro de la proteína a los microorganismos del rumen y lo relaciona con sus requerimientos.
- Se asume que la proteína no degradada en el rumen de alimentos concentrados contiene 85% de aminoácidos mientras que la de forrajes contiene 65%. Otros sistemas, a excepción del de Alemania, utilizan un valor de 100% de aminoácidos en la proteína no degradada del alimento.
- La síntesis de proteína microbiana se relaciona con la cantidad de carbohidratos totales digeridos y el valor utilizado en este sistema para la cantidad de proteína microbiana sintetizada en el rumen es más elevado que en otros sistema.

Se requiere conocer las posibilidades de este Sistema para la valoración proteica de alimentos no convencionales, de composición extrema o que contengan compuestos no nutritivos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

EXPERIMENTAL - PART 2

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. MATERIAS PRIMAS: OBTENCIÓN, PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Se han utilizado dos subproductos, derivados de la industria de extracción del aceite de oliva: orujo de dos fases y hojas de limpia, obtenidos según se indica en la Figura 1.

3.1.1. Orujo de aceituna.

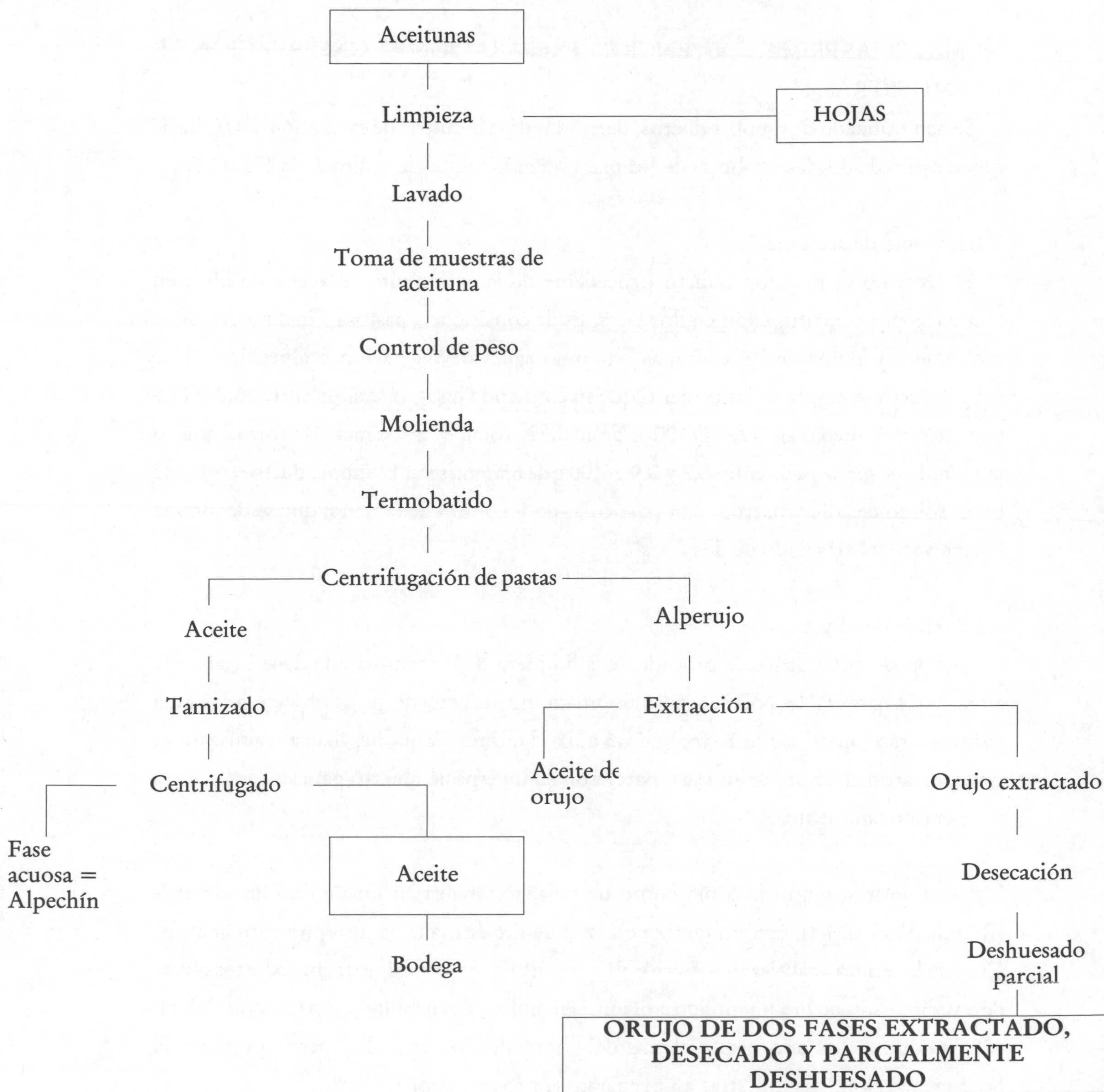
El alperujo es un subproducto procedente de la extracción del aceite de oliva en almazara, por centrifugación en dos fases. Es de consistencia pastosa e incluye restos de piel, hueso y pulpa de las aceitunas así como aguas de vegetación o alpechines. Este subproducto se deseca en las orujeras que su contenido en agua se sitúa entre 13,2 y 10,8 con un valor medio de 12,4 g/100 g de materia total, y se extrae de forma que su contenido en grasa oscila entre 0,7 y 0,9 g/100 g de materia seca. El subproducto resultante es un sólido de color marrón, con partículas de 1 a 3 mm de tamaño, que se denomina “orujo seco y extractado de dos fases”.

3.1.2. Hoja de olivo.

La hoja de olivo utilizada procede de la limpieza de la aceituna que tiene lugar en la almazara (Figura 1). La hoja se separa automáticamente antes de que se procese la aceituna para la extracción del aceite. Se recogieron hojas el mismo día que llegaban a la almazara, se transportaron al laboratorio y se esparcieron en un espacio abierto para su desecación a temperatura ambiente.

Las muestras, tanto de orujo como de hoja, se muelen en un molino de cuchillas (Retsch, Mod. SM-1), con un tamiz de 2 mm de luz de malla para su posterior análisis. Cuando la técnica analítica lo requirió, alícuotas de las muestras de los subproductos objeto de estudio se sometían a un molido adicional en molino de cuchillas (Glen Creston Ltd. 14-680 Stanmore), dotado de un tamiz de 1 mm de luz de malla, para optimizar la homogenización. Las muestras así preparadas se conservaron a -18°C .

Figura 1- Esquema del proceso de extracción del aceite de oliva por centrifugación en dos fases.



3.2. ANIMALES EXPERIMENTALES.

Se han utilizado seis animales adultos: tres moruecos de raza segureña y tres cabras de raza granadina, cuyos pesos vivos medios fueron de $61,4 \pm 3,32$ y $39,4 \pm 2,62$ kg, respectivamente. Durante el periodo de adaptación a las dietas experimentales, los animales se mantienen alojados en jaulas individuales de 0,9 x 1,2 m con suelo plástico de rejillas, provistas de bebedero y comederos independientes para heno y concentrado. Todos los animales estaban dotados de cánula ruminal permanente y se alimentaron, a nivel de mantenimiento con las dietas experimentales.

3.2.1. Construcción de cánulas ruminales.

Se utiliza goma sin recauchutar, cruda y neutra de 0,8-1 mm de espesor (Michelín, ref. RIDAR 1-8, 580820) y un molde de aluminio construido para este fin. 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. Cuando el molde se enfría, se extrae la cánula cuyo orificio central se cierra, una vez implantada esta en el animal, mediante un tapón de silicona sellante comercial, fabricado expresamente empleando un molde de escayola.

3.2.2. Implantación quirúrgica de cánulas ruminales.

Los animales experimentales se tratan con un antiparasitario (Ivomec, Lab MSD AGVET, 0,5 ml/kg de peso vivo) vía oral, una semana antes de la intervención quirúrgica. Durante los dos días previos a la intervención se administra, intramuscularmente, un antibiótico con acción bactericida sobre gérmenes anaerobios (Augmentine, Lab. Smithkline Beecham; 0,14 ml/kg de peso vivo). Los animales no reciben alimento durante las 36 horas previas a la intervención quirúrgica y son privados de agua durante las 24 horas previas a dicha intervención. 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) y como anestésico Ketolar (Lab. Parke-Davis). El preanestésico se administra intramuscularmente en una dosis de 0,15 ml/10 kg de peso vivo del animal. El anestésico se aplica lentamente, vía intravenosa (yugular o radial), en una dosis inicial de inducción de 2 mg/kg de peso vivo. El mantenimiento del estado de anestesia se consigue mediante la aplicación, por la

misma vía, de 1 mg de anestésico por kilo de peso vivo, a requerimiento de las manifestaciones de disminución del estado de anestesia del animal.

La cánula se implanta en la fosa prelumbar izquierda del rumen. Para ello, se rasura y desinfecta la zona lavando con jabón antiséptico y aplicando povidona yodada (Betadine, Lab. Rovi) con una torunda. 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 seccionando posteriormente 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 y se practica en él una incisión vertical en la que se implanta 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: el peritoneo se une al músculo transversal del abdomen y los dos músculos oblicuos del abdomen se unen conjuntamente; 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, transcurridas 24 horas de la intervención quirúrgica, se les suministra agua, heno de alfalfa y mezcla mineral-vitaminica. Durante los tres días posteriores a la intervención se controla diariamente la temperatura rectal de los animales y se les administran antibióticos en las condiciones ya mencionadas para el periodo preoperatorio.

3.3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES.

3.3.1. Digestibilidad intestinal *in vitro*.

Se emplea la técnica descrita por CALSAMIGLIA y STERN (1995), realizándose las determinaciones sobre muestras desecadas y molidas en molino de cuchillas (Retsch, Mod. SM-1) con tamiz de 2 mm de luz de malla. Con objeto de discernir el efecto de la especie animal, en cuyo rumen se lleva a cabo la preincubación de las muestras, se realizan determinaciones paralelas de todas las muestras en caprino y ovino. Se han utilizado tres moruecos de raza segureña y tres cabras de raza granadina, provistos de cánula ruminal. Los animales se alimentan a nivel de mantenimiento (AGUILERA *et al.*, 1986; PRIETO *et al.*, 1990), con heno de alfalfa de buena calidad cuya composición (g/100g MS) se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química (g/100 g MS) del heno de alfalfa.

MS, g/100 g MF	87,1
MO	89,2
FND	45,1
FAD	36,6
LAD	7,56
PB	16,7
N-FAD, g/100g Nt	8,82
EE	1,87
EB, MJ/kg MS	17,2

Alícuotas de aproximadamente 1,5 g de la muestra se introducen en sacos de nylon (15.800 poros/cm² y 46 μ m de lado del poro) de 10x7cm de tamaño y se suspenden en el rumen de los animales durante 16 horas. Muestras de los subproductos del olivar se incubaron además durante 48 horas para determinar el efecto del tiempo de permanencia en el rumen. Dependiendo del contenido en nitrógeno de las muestras y de la degradabilidad ruminal del mismo, se incuban de cinco a ocho sacos en cada uno de los animales, para obtener al menos 60 mg de nitrógeno residual no degradado en el rumen, por animal y para cada alimento.

Los residuos no degradados en rumen, contenidos en los sacos incubados en un mismo animal, se mezclan utilizándose alícuotas de esos residuos para la determinación del contenido en nitrógeno. A continuación, en tubos de centrífuga de 50 ml de capacidad, se pesa una cantidad suficiente de la mezcla que contenga 15 mg de nitrógeno del alimento no degradado. Se añaden a cada tubo 10 ml de una solución 0,1 N de HCl a pH 1,9 que contiene 1 g/l de pepsina (Sigma P-7012), se agitan e incuban durante una hora en un baño a 38°C manteniéndose con agitación continua.

Tras la incubación se adicionan a cada tubo 0,5 ml de NaOH 1N, para elevar el pH a 7,8 y 13,5 ml de una solución de pancreatina (tampón de KH₂PO₄ 0,5N a pH 7,8 que contiene 50 ppm de timol y 3 g/l de pancreatina, Sigma P-7545). Se agitan los tubos y se incuban a 38°C durante 24 horas en un baño de agua, con agitación continua. Además, cada tubo se agita individualmente a intervalos de 8 horas, aproximadamente. Transcurrido este periodo se añaden, inmediatamente, 3 ml de ácido tricloroacético al 100% p/v para detener la reacción enzimática y precipitar la proteína no digerida; se agitan los tubos y se mantienen en reposo durante 15 minutos. Se centrifugan a 10.000 g durante 15 minutos y se conserva el sobrenadante para la posterior determinación de su contenido en nitrógeno.

La digestión en pepsina-pancreatina de la proteína no degradada en rumen se calcula como la proporción entre la cantidad de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético y la cantidad de nitrógeno contenido en el residuo no degradado en rumen.

3.4. ENSAYOS CON FERMENTADORES DE FLUJO CONTINUO.

3.4.1. Dietas experimentales.

Las dietas ensayadas están constituidas por heno de alfalfa, concentrado o por hoja de olivo, como componentes principales.

La composición en ingredientes de las dietas experimentales suministradas a los fermentadores (Tabla 2) es igual que la de las suministradas a los animales donadores de los inóculos ruminales correspondientes. Las cantidades en que dichas dietas se suministran a los fermentadores se calcularon para simular la ingesta de los animales en mantenimiento, considerando un volumen ruminal de 14 litros en el caso de ovino y de 17 litros en el caprino.

Tal y como se detalla en la Tabla 2, las dietas suministradas fueron: heno de alfalfa (HA), concentrado a base de orujo y heno de alfalfa (HACO), concentrado a base de orujo, heno de alfalfa y una dosis de PEG (HACOP), hoja de olivo (HO) y hoja de olivo más un suplemento energético-proteico (HOSUP).

El concentrado estaba compuesto por 1/3 de orujo, 2/3 de cebada grano caballar y una mezcla minero-vitamínica (20 g/kg de concentrado). Una parte de esa mezcla minero-vitamínica (25%) fue elaborada a partir de las cenizas provenientes de la incineración del orujo en las orujeras.

La elaboración de la mezcla minero-vitamínica implica una primera fase en la que se mezclan los compuestos que son fuente de macro y microminerales en el siguiente orden: óxido de cobalto, yodo, óxido de cobre, vitaminas A + D₃, óxido de cinc, selenio, óxido de cobalto, sulfato magnésico, fosfato monocálcico y cloruro sódico.

En una segunda fase, se añade a la mezcla anterior una determinada cantidad de las cenizas mencionadas anteriormente. La composición, por kg de estas cenizas, es la siguiente: fósforo 17,5 g, potasio 20,1 g, calcio 149,8 g, magnesio 45,2 g, sodio 3,2 g, hierro 17,9 g, manganeso 438,3 mg, cobre 206,7 mg y cinc 183,3 mg.

La composición final de la mezcla minero-vitamínica completa fue : fosfato monocálcico (250 g/kg), sulfato magnésico (200 g/kg), cloruro sódico (277 g/kg), cenizas de orujo (270 g/kg), óxido de cobalto (8,5 mg/kg), óxido de cobre (238 mg/kg), óxido de

cinc (2,45 g/kg), yodo (25 mg/kg), selenio (4 mg/kg) y preparado de vitaminas A+D₃ (83.500 y 16.700 U.I. para vitamina A y D₃, respectivamente).

Los ingredientes que forman parte del concentrado (alperujo, cebada y mezcla minero-vitamínica) se mezclan inmediatamente antes del proceso de granulación en la misma planta. La mezcla se calienta por inyección de vapor para facilitar su compactación, ya que así se aumenta su contenido en humedad y su temperatura; esto hace que las grasas se ablanden y que el almidón se hinche, lo que disminuye el coeficiente de frotamiento en el momento de pasar a la matriz. La presión de vapor se sitúa entre 3 y 6 Kg, que corresponde a temperaturas de vapor de 143 a 164 °C y aportes de 2 a 3,7 g por litro de vapor inyectado, respectivamente. La temperatura óptima del concentrado para obtener el mayor rendimiento es de 70 a 80 °C. La humedad para obtener el máximo de dureza en el gránulo es de, aproximadamente, 16 a 17 %.

Tabla 2. Composición (g/kg materia original) en ingredientes de las dietas experimentales suministradas a los fermentadores y a los animales donadores de los inóculos.

ingredientes	HA	CO	HO	PEG-4000	Habas	Cebada	MMV
Dietas HA	993						7,00
HACO	600	400					
HACOP	587	392		21			
HO			993				7,00
HOSUP			662		99	232	7,00

HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa y concentrado; HACOP: heno de alfalfa, concentrado y PEG; HO: hoja de olivo procedente de la limpieza de la aceituna en almazara; HOSUP: hoja de olivo suplementada con habas y cebada; MMV: mezcla minero-vitamínica.

3.4.2. Procedimiento experimental.

Se utiliza un sistema abierto de fermentadores de flujo continuo, contruidos siguiendo el esquema de MIETTINEN y SETÄLÄ (1989), con numerosas modificaciones realizadas por nuestro grupo (en nuestros ensayos no se recoge el gas; el pH en los fermentadores se mide 2 veces al día y no está continuamente controlado con la adición automática de una solución Na₂CO₃, el potencial redox no se mide diariamente antes del suministro del alimento; la saliva artificial se elabora según la fórmula de MCDUGALL (1984) sin diluir con agua y no contiene urea; la agitación es continua y no cada 4 minutos). Dicho sistema consta de 8 frascos de fermentación de 1 litro de capacidad cada uno y de 8 matraces en los

que se recogen los efluentes procedentes de los fermentadores. Los frascos de fermentación se mantienen en un baño de agua a 39°C, se inoculan al inicio de cada ensayo, con 700 ml de fluido ruminal que procede del filtrado de una mezcla de contenido ruminal extraído de tres moruecos o de tres cabras fistulados en el rumen y alimentados con las dietas experimentales descritas en el apartado 3.4.1, a nivel de mantenimiento. La extracción del contenido ruminal se realiza dos horas después del suministro del alimento de la mañana. Se procede a la extracción, a través de la cánula, de cantidades iguales de contenido ruminal de cada uno de los animales de la misma especie 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. Se forman dos mezclas homogéneas, una con contenido ruminal extraído de ovino y otra con contenido ruminal de caprino, que se mantienen en sendos vasos Dewar, precalentados a 38°C. Se filtran por separado a través de dos capas de gasa y el filtrado se inocula en los frascos de fermentación.

En los fermentadores se infunde saliva artificial (MCDUGALL, 1948), mediante una bomba peristáltica (Watson-Marlow 313), con un flujo continuo de 40 ml/h. Para mantener la anaerobiosis, cada frasco de fermentación se somete a un borboteo continuo de CO₂. El contenido de los fermentadores se mantiene en agitación constante mediante un motor giratorio y una varilla de acero, con una hélice tripala en su extremo inferior, que se mantiene a 1/3 del fondo del frasco de fermentación. La varilla se introduce en el fermentador a través de un cierre de agitación hermético.

A cada frasco de fermentación se suministran diariamente 60 g de materia fresca (aproximadamente 45 g de MS) de la correspondiente dieta experimental que es la misma que la que consumen los animales donadores del inóculo ruminal. También se suministran aproximadamente 0,4 g de una mezcla minero-vitamínica para las dietas que no incluyen el concentrado descrito en el apartado 3.4.1, ya que este incluye también la misma cantidad de dicha mezcla. La ración se suministra en dos porciones, de igual tamaño a las 09:00 y a las 16:00 horas.

El pH del contenido de los fermentadores se controla dos veces al día, justo antes del suministro de alimento, por la mañana y por la tarde.

Los matraces en los que se recogen los efluentes se mantienen en un baño frío a una temperatura de 3°C, con el fin de detener la actividad microbiana. En cada ensayo, y tras un periodo de estabilización de 7 días, se realiza un muestreo de los efluentes para aislar microorganismos ruminales coincidiendo con el día 8 del ensayo y, a continuación, durante 3 días consecutivos se recogen diariamente los efluentes y se registra su peso y volumen,

almacenándose a -18°C . Los efluentes de los tres días de muestreo, correspondientes a cada uno de los fermentadores, se recogen conjuntamente. Tras el mencionado periodo de muestreo se lleva a cabo un periodo de incubación de los sacos, tal como se describe en el apartado 3.4.2.1. Al final de cada ensayo también se recoge cuantitativamente el contenido residual de cada uno de los frascos de fermentación, se anota su peso y volumen y se almacenan a -18°C .

Una alícuota de 5 ml de efluentes se recoge, cada uno de los días de muestreo, y se fija con 1 ml de HCl 0,2 N para la determinación del contenido en nitrógeno amoniacal. Otra alícuota de 3 ml se fija con 0,5 ml de HgCl 1% y 0,5 ml de ortofosfórico a 5% para la determinación del contenido en ácido grasos volátiles. Las alícuotas de los tres días de muestreo, correspondientes a cada uno de los efluentes se reúnen, obteniéndose solo 2 muestras que son las que se utilizan para las determinaciones de amonio y de AGVs, respectivamente.

Del contenido de los fermentadores, el último día de muestreo se separan 3 alícuotas, una para la determinación de $\text{NH}_3\text{-N}$, otra para la de AGV, que se fijan de manera descrita anteriormente, y una tercera que se liofiliza para la determinación de taninos condensados totales. El resto, se almacena para la extracción de microorganismos tal como se describe en el apartado 3.4.2.3.2.

La digestibilidad de cada nutriente en los fermentadores se calcula como la proporción entre la cantidad diaria en que aparece dicho nutriente en el efluente y la suministrada al frasco de fermentación. En el caso de la materia seca, es necesario realizar una corrección que tenga en cuenta las cantidades de sales disueltas en la saliva artificial infundida y de la masa microbiana producida (HOOVER *et al.* 1976b; CRAWFORD *et al.* 1980a).

$$DMS, \% = 100 * \frac{MSA - (MSE - S) + MSM}{MSA}$$

donde

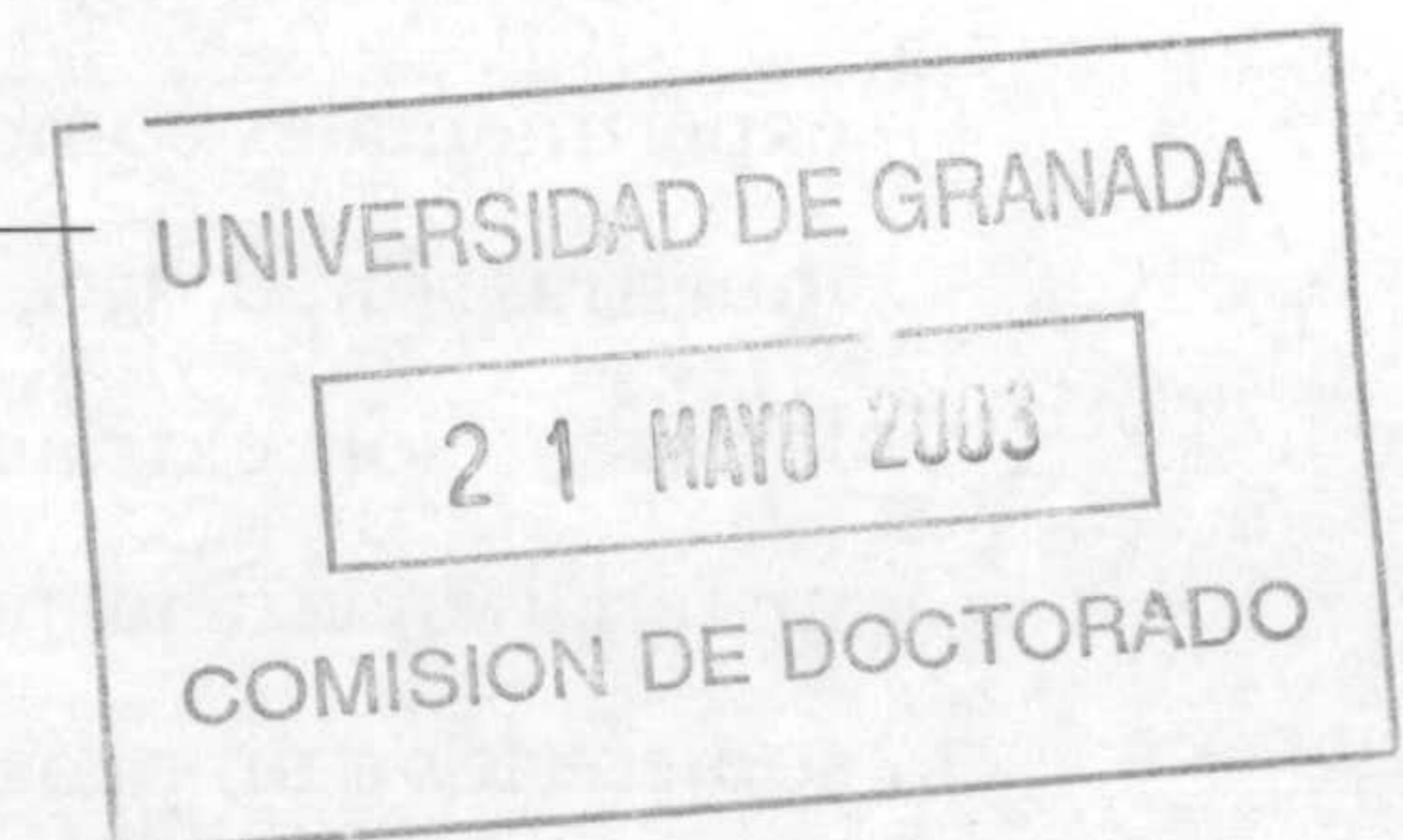
DMS = digestibilidad de la materia seca

MSA = MS del alimento, g/24 h x % MS alimento

MSE = MS del efluente, g/24 h x % MS efluente

S = litros de saliva en 24 h x gramos de sales/litro de saliva artificial

MSM = MS microbiana producida en 24 h, g



El cálculo de la digestibilidad de la proteína en los fermentadores requiere, también, corregir para la cantidad de proteína microbiana producida diariamente.

Los carbohidratos totales presentes en el alimento se calculan como la materia orgánica libre de proteína y grasa. Para calcular la cantidad de carbohidratos totales producidos en los efluentes, es necesario restarle al total, obtenido como se ha mencionado anteriormente, la cantidad de hexosas utilizadas para la producción de ácidos grasos volátiles, estimada según DEMEYER y VAN NEVEL (1979), como:

$$n^{\circ} \text{ mol } C_6H_{12}O_6 = \frac{\text{mol acético}}{2} + \frac{\text{mol propiónico}}{2} + \text{mol butírico}$$

3.4.2.1. Degradabilidad *in sacco*.

Para la determinación de la degradabilidad *in sacco* de los materiales objeto de estudio (concentrado, heno de alfalfa, hoja de olivo, cebada, habas, dietas experimentales) en los fermentadores, se sigue la técnica *in sacco* y la metodología descrita por MADSEN y HVELPLUND (1994) *in situ*. Se utilizan sacos de nylon (15.800 poros/cm² y 46 µm de lado del poro) de 5x4 cm de tamaño. En cada saco, previamente desecado en estufa a 60°C y tarado, se introducen aproximadamente 1,4 g de muestra desecada a 60°C y molida con tamiz de 2 mm de luz de malla. Los sacos así preparados se introducen en los fermentadores, se sujetan en el fondo con una varilla de hierro y a uno de los orificios de salida del fermentador con hilo de pescar cerrándose el orificio rápidamente con tapón de silicona y papel de parafina para evitar la entrada de aire al fermentador.

Las determinaciones se realizan en los fermentadores inoculados con líquido ruminal de ovino de raza segureña o caprino de raza granadina, y alimentados con las dietas experimentales como se describe en el apartado 3.4.1. Los tiempos de incubación de las muestras son, 0, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 horas. Tras el periodo de incubación correspondiente, los sacos son extraídos del fermentador y lavados en agua corriente para eliminar el material superficial más grosero, pasándose a continuación a una lavadora automática para someterlos a un programa de lavado corto en frío. A continuación, el contenido de cada saco se trasvasa a una bolsa de polietileno con agua y se somete a un golpeteo mecánico (Masticator IUL Instruments), para evitar el efecto de la posible contaminación con microorganismos del contenido del fermentador, que pueden estar adheridos a partículas del alimento incubado.

Una vez trasvasado, de nuevo, el contenido de las bolsas a sus respectivos sacos, estos se desecan a 60°C en estufa de ventilación forzada durante 48 horas, se introducen en un desecador, y tras estabilizarse a temperatura ambiente durante 2 horas, se pesan conservándose el residuo para la posterior determinación analítica de sus contenidos en nitrógeno.

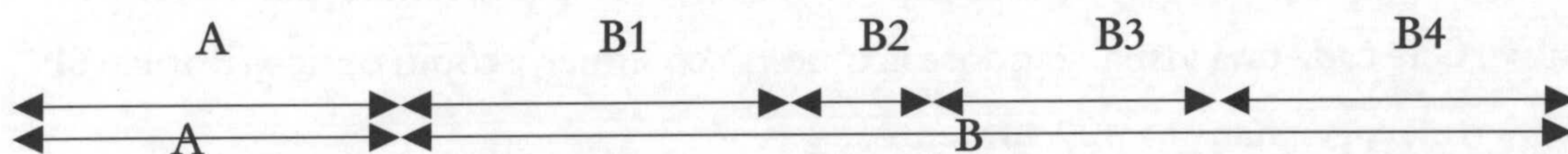
Los perfiles de degradación de la materia seca y de la proteína se obtienen siguiendo el modelo de ØRSKOV y MCDONALD, (1979) que se ajusta como $Dg = a + b \cdot (1 - e^{-ct})$. Las constantes a y b representan las fracciones soluble e insoluble potencialmente degradable, respectivamente; c representa el ritmo fraccional de degradación de la fracción b , $a + b$ representa la degradación potencial; y t el tiempo de incubación en el rumen.

Conocidas las constantes del perfil de degradación, la degradación efectiva DE se calcula como

$$DE = a + \frac{b \cdot c}{c + k}$$

Siendo la constante k la velocidad de flujo de salida de los efluentes de fermentadores, calculado en cada ensayo.

Figura 2.- Esquema general del desarrollo de los ensayos.



A: Periodo de adaptación de los animales donadores del inóculo ruminal a las dietas experimentales (14 días).

B: Desarrollo de los ensayos con los fermentadores.

B1: periodo de adaptación de los fermentadores a la dieta experimental (7 días).

B2: primer día de muestreo para aislar bacterias.

B3: 3 días de muestreo de los efluentes: toma de alícuotas para el análisis de N-NH₃, AGV, MS, MO, N_t, N-FAD, N-AA, N-BP, FND, FAD, LAD, EE, EB y TCT.

B4: periodo de incubación de los sacos en los fermentadores para la determinación de la degradabilidad *in sacco* (3 días).

3.4.2.2. Recuento e identificación de protozoos.

La identificación y recuento de protozoos, se realiza en el primer ensayo. Cada día, a lo largo de todo el ensayo, y justo antes del suministro del alimento, se toman alícuotas de 10 ml, tanto del contenido de los frascos de fermentación, como de los efluentes para su fijación, tinción y posterior conteo de protozoos siguiendo la técnica descrita por DEHORITY (1984). También se realizó el conteo de protozoos en alícuotas del filtrado ruminal, obtenido de los animales y utilizado como inóculo en los fermentadores. La alícuota se traspasa a un tubo de cultivo de 20 x 150 mm y se le añaden 10 ml de una solución de formaldehído al 9.25%. Una vez homogenizada la muestra, se toma 1 ml con una pipeta de orificio suficientemente grande (3 mm) y se traspasa a un tubo de cultivo de 16 x 150 mm con tapón de rosca. Se le añaden dos gotas de una solución que contiene colorante para tinción verde brillante (2 g de colorante y 2 ml de ácido acético glacial, disueltos en agua desmineralizada hasta un volumen de 100 ml). La mezcla se agita y se deja reposar durante una noche para que tenga lugar una adecuada tinción celular. A continuación, se añaden 9 ml de una solución de glicerol al 30%, resultando una dilución final de la muestra original de 1:20. Una vez fijada, teñida y adicionada de una solución de glicerol, la muestra puede conservarse a temperatura ambiente para el posterior conteo de células. Antes de proceder a la identificación y conteo de protozoos de las muestras previamente fijadas y teñidas, se agita cada tubo, se toma una pequeña cantidad con pipeta pasteur, suficiente para depositar 2 gotas en la cámara de conteo. El conteo se realiza en un cámara de Neubauer con dos rejillas separadas y provistas de cuatro cuadrados de 1 mm² de superficie cada una visualizándose la muestra con microscopio óptico (Priplan 6F 10x, Leitz wttzler, germany) a 400 aumentos.

En total se contaron 40 campos por muestra. El número medio de células observadas en cada campo se multiplica por la dilución de la muestra original y por 10.000, obteniéndose así el número de protozoos por ml de líquido ruminal original.

Paralelamente, se procedió a la clasificación de los protozoos pertenecientes a los ordenes *Entodiniomorpha* (entodiniomorfos) y *Trichostomatia* (holotricos), ambos de la clase Ciliata.

3.4.2.3. Aislamiento de bacterias.

3.4.2.3.1. En los efluentes.

Tras la adaptación de los fermentadores a la correspondiente dieta experimental (7 días), los efluentes del octavo día se utilizan para la determinación del extracto bacteriano. Los efluentes de cada fermentador son sometidos a un golpeteo mecánico con masticador

(Masticator IUL Instruments) durante 5 minutos, y luego filtrados a través de 8 capas de gasa hidrófila y una capa de tela de nylon de tamaño de poro de 46 μm . El material sólido resultante de la filtración se lava con una solución salina fisiológica (0,9 g de NaCl / 100 ml de agua desmineralizada), se borbotea con CO_2 durante 5 - 10 segundos, y se mantiene 1 hora a 0°C en un vaso de precipitado, cerrado con papel de aluminio para mantener la anaerobiosis y, tras este periodo, se le aplica otra vez el golpeteo mecánico con masticador durante 5 minutos filtrándose de nuevo a través de 8 capas de gasa y una tela de nylon de 46 μm de poro. Este filtrado se combina con el primero y se centrifuga la mezcla a $820 \times g$ durante 10 minutos, utilizándose una centrifuga (KUBOTA KS-5200C) con rotor (KUBOTA RS-4/6). Mediante esta centrifugación se separan las partículas de alimento y protozoos que pudieran estar presentes en la muestra. El sobrenadante se centrifuga a $47.800 \times g$ durante 10 minutos a 4°C en una centrifuga Sorvall RC-5C (Sorvall instruments DUPONT) con rotor sorvall (SS-34) despreciando, en este caso, el sobrenadante. El precipitado es recuperado en las placas de Petri y representa la fracción de bacterias de los efluentes (BE) según se indica en la figura 3. La muestra se conserva a -20°C para su posterior liofilización y análisis.

3.4.2.3.2. En los contenidos de los vasos de fermentación.

Las fracciones microbianas asociadas a partículas (BAS) y a la fase líquida (BAL), se aíslan a partir del contenido de los vasos de fermentación del último día de cada ensayo. El contenido del fermentador se filtra a través de 8 capas de gasa y una tela de nylon de 46 μm de tamaño de poro, obteniéndose un primer filtrado (1). El sólido es resolubilizado en una solución salina fisiológica (NaCl 0,9 g/100 ml de agua destilada) y filtrado otra vez como se ha descrito anteriormente, obteniéndose un segundo filtrado (2) que se combina con el primero. La mezcla de los filtrados (1) y (2) representa la fracción de las bacterias asociadas al líquido (BAL). A esta mezcla se aplica una centrifugación diferencial como se ha descrito en el apartado 3.4.2.3.1 y el sólido se resolubiliza una vez más en solución salina y se mantiene 1 hora a 0°C . Se somete, a continuación, a un golpeteo mecánico con masticador durante 5 minutos, se filtra según el procedimiento descrito anteriormente y se obtiene un nuevo filtrado (3). El sólido se a resolubiliza, se somete a golpeteo mecánico y se filtra de nuevo. El filtrado obtenido (4) se combina con el filtrado (3) y esta mezcla representa las bacterias asociadas a la fase sólida (BAS). La mezcla se somete al mismo proceso de centrifugación diferencial que

fue descrito en el apartado 3.4.2.3.1 y según la figura 4. Las muestras son liofilizadas y conservadas para su posterior análisis.

3.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS.

3.5.1. Materia seca.

La humedad de una muestra se determina como la pérdida de peso que experimenta una muestra tras ser sometida a desecación durante un periodo adecuado de tiempo, a $103 \pm 1^\circ\text{C}$ en estufa de ventilación forzada. El contenido en materia seca se obtiene por diferencia entre 100 y el contenido en humedad. En aquellos casos en que se parte de material muy húmedo, éste se liofiliza previamente (muestras del contenido residual de los fermentadores y de los efluentes) y los valores de materia seca se corrigen, realizándose una desecación posterior a $103 \pm 1^\circ\text{C}$ según el protocolo estándar (AOAC, 1984).

3.5.2. Materia orgánica.

Las cenizas totales se obtienen por calcinación de 1 a 2 g de muestra en horno mufla a 550°C durante 5 horas. El contenido en materia orgánica se determina por diferencia entre 100 y el contenido porcentual de cenizas totales, referido a materia seca.

3.5.3. Extracto etéreo.

Para su determinación se utiliza un equipo Soxhlet. La extracción se realiza sobre aproximadamente 5 g de muestra finamente dividida y colocada en un cartucho cerrado de papel de filtro. Las muestras así preparadas se maceran en éter de petróleo, durante aproximadamente 20 horas y se extraen, a continuación, durante 6 a 8 horas. Finalizado el proceso de extracción, el matraz que contiene la grasa extraída se deseca en estufa a 60°C . El aumento de peso que experimenta el matraz corresponde a la grasa de la muestra. El contenido en grasa se expresa en base a la materia seca.

3.5.4. Energía bruta.

La energía bruta (entalpía o calor de combustión) de muestras de los ingredientes de las dietas experimentales así como de los efluentes, se determina utilizando una bomba calorimétrica adiabática instalada en un laboratorio termorregulador a $20 \pm 2^\circ\text{C}$. En el interior del cuerpo de la bomba se colocan 2 ml de agua destilada y, sobre el soporte de uno de sus electrodos, un crisol adecuado para la combustión en el que se introduce

aproximadamente 1 g de la muestra contenido en una bolsita de polietileno, cuyo calor de combustión se determina previamente. Entre los electrodos se fija un trozo de hilo de níquel-cromo, al que se une una hebra de algodón, cuyo extremo contacta con la bolsa que contiene la muestra. El calor de combustión de ambos tipos de hilo se determina previamente y la longitud de los mismos se mantiene constante en las distintas determinaciones. Una vez ensamblados los distintos elementos y comprobado el circuito de encendido, se llena lentamente el recipiente con oxígeno hasta conseguir una presión de 30 atmósferas situándose, a continuación, en el interior del vaso calorimétrico que, contiene $2.100\text{g} \pm 0,5$ de agua. Posteriormente y tras comprobar el montaje correcto del aparato, se realizan las operaciones necesarias para determinar el contenido calórico de la muestra: se mantiene el aparato funcionando de 5 a 10 minutos para alcanzar una temperatura constante en el agua del vaso del calorímetro (T_i); seguidamente, se induce la combustión de la muestra y se esperan de 10 a 15 minutos hasta que la temperatura se estabiliza (T_f).

El calor de combustión, entalpía o energía bruta de la muestra viene dado por la fórmula:

$$\text{Calor de combustión, cal/g} = \frac{K * (T_f - T_i) - a}{P}$$

en donde: K = Factor de la bomba o capacidad de calor efectiva (cantidad de calorías necesarias para que, en el equipo empleado, la temperatura del agua del vaso calorimétrico aumente 1°C). Se determina por combustión de un comprimido de ácido benzóico puro cuyo valor calórico es conocido; T_i y T_f = temperaturas estables previa y posterior a la combustión de la muestra problema, respectivamente. La temperatura es detectada por una sonda termométrica introducida en el vaso y conectada a un termómetro digital; a = suma total de calorías del hilo metálico, de la hebra de algodón y de la bolsa de polietileno que se queman junto con la muestra; P = peso de la muestra en gramos de materia seca.

3.5.5. Componentes fibrosos.

Se determinan de acuerdo el esquema analítico de van Soest (VAN SOEST et., 1991), utilizando la tecnología de Ankom Corporation®. Para ello, se emplean sacos de poliéster (Ankom Corp. #F₅₇), libres de nitrógeno y cenizas, previamente desecados en estufa de ventilación forzada a $103 \pm 1^\circ\text{C}$ y tarados, en los que se pesan 0,5 g de muestra. A continuación, se sellan con calor (selladora térmica Matachana M-06597) y se agitan energicamente para conseguir que la muestra se reparta de manera homogénea en su interior. Una vez así preparados, se colocan un total de 24 sacos sobre un suspensor, que se

introduce en la cubeta de digestión del analizador (Ankom²⁰⁰), rellenándose esta con 2 litros de la solución correspondiente (detergente neutro o ácido).

La digestión tiene una duración de 60 minutos a partir del momento en que la solución alcanza la temperatura de ebullición. Al cabo de ese tiempo, se realiza el aclarado de los sacos, que consiste en tres lavados, de tres minutos de duración cada uno, con agua destilada a 90-100°C. A continuación, se retiran los sacos eliminándose el exceso de agua mediante presión y se sumergen en acetona durante otros tres minutos. Transcurrido ese tiempo se elimina el exceso de acetona y se dejan secar los sacos a temperatura ambiente durante una hora. La desecación se completa en estufa ($103 \pm 1^\circ\text{C}$) hasta peso constante.

3.5.5.1. Fibra neutro detergente (FND).

El material celular soluble se extrae por ebullición, durante una hora, en una solución de detergente neutro (lauril sulfato sódico) que contiene EDTA disódico. Los componentes solubles, fácilmente utilizables desde el punto de vista nutritivo, se separan de aquellos que requieren mayor tiempo de fermentación microbiana para su utilización digestiva. El material insoluble en detergente neutro, libre de cenizas, constituye la fibra neutro detergente (FND). Los materiales solubles en detergente neutro o contenidos celulares se obtienen por diferencia entre 100 y el contenido porcentual de FND de la muestra, expresado en materia seca.

3.5.5.2. Fibra ácido detergente (FAD).

Es el residuo, constituido fundamentalmente por lignocelulosa, que se obtiene tras someter la muestra a digestión con solución de detergente ácido (bromuro de cetiltrimetilamonio), en medio sulfúrico, y calcinación a 550°C en horno mufla. Ese residuo, libre de las cenizas, constituye la fibra ácido detergente (FAD). El contenido en hemicelulosa se calcula como la diferencia entre los contenidos porcentuales de fibra neutro y ácido detergente de la muestra, expresados en materia seca.

3.5.5.3. Lignina ácido detergente (LAD).

Es la fracción de la pared celular, constituida fundamental, aunque no exclusivamente, por lignina. El saco que contiene el residuo obtenido tras la incubación de la muestra en detergente ácido, se sumerge en ácido sulfúrico al 72% durante 3 horas. Pasado este tiempo, se lavan los sacos con agua destilada caliente hasta obtener un pH neutro en el agua de lavado, se aclaran con acetona para retirar el agua, se desecan al aire y se completa

la desecación a $103 \pm 1^\circ\text{C}$. Una vez secos, se pesan y se incineran en un horno de mufla a 550°C para determinar su contenido en cenizas. El residuo libre de cenizas constituye la fracción denominada lignina ácido detergente. La celulosa se obtiene por diferencia entre los contenidos porcentuales de fibra y lignina ácido detergente de la muestra correspondiente, expresados en materia seca.

3.5.6. Componentes nitrogenados.

3.5.6.1. Proteína bruta.

Se calcula a partir del contenido en nitrógeno total obtenido según el método Kjeldahl, aplicando el factor multiplicador 6,25.

De 1 a 2 g de muestra se mineralizan en ácido sulfúrico concentrado a 360°C , utilizándose un catalizador constituido por 100 partes de sulfato potásico, 6 de sulfato de cobre y 1 de selenio. Como resultado de dicha mineralización, el nitrógeno de la muestra se transforma en sulfato amónico. Mediante ebullición en un destilador Büchi, se destila el amoniaco de una alícuota del mineralizado que se produce en presencia de un exceso de hidróxido sódico. La destilación del amoniaco producido se realiza en corriente de vapor y se recoge en agua destilada. La valoración potenciométrica de la solución se lleva a cabo con ácido clorhídrico 0,05 N, en equipo automático provisto de un electrodo de pH, hasta punto final (pH=5,25).

3.5.6.2. Nitrógeno asociado a la fracción lignocelulósica (N-FAD).

Se obtiene por digestión en ácido sulfúrico, destilación del amoníaco y valoración potenciométrica, como se ha descrito en el apartado anterior, del residuo seco que se genera tras el tratamiento de la muestra con solución de detergente ácido. La cantidad de nitrógeno asociado a esta fracción de la pared celular se expresa como porcentaje del nitrógeno total contenido en la muestra, en relación a la materia seca (g N-FAD/100g Nt).

3.5.6.3. Nitrógeno aminoacídico.

Se determina la composición en aminoácidos de muestras de orujo, hoja de olivo, concentrado, heno de alfalfa, cebada, habas, efluentes así como de la masa microbiana aislada tanto en los efluentes como en los contenidos de los fermentadores. En el caso de los efluentes y de la masa microbiana se ha incluido la determinación del ácido diaminopimélico (DAPA), aminoácido característico de las paredes bacterianas y que se utiliza como marcador para estimar la producción de proteína bacteriana.

El método analítico utilizado es la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa, previa derivatización del hidrolizado de la muestra correspondiente con fenilisotiocianato (PITC, Pierce NCI-2530). Se sigue el método Pico-Tag para hidrolizados (COHEN et al., 1989), cuya bondad ha sido contrastada previamente en nuestro laboratorio (PÉREZ MARTÍNEZ, 1995).

Una alícuota de la muestra se pesa en balanza analítica sobre un tubo Pirex de tapón roscado de 10 ml de capacidad, en cantidad suficiente para que el contenido en proteína bruta sea de 15 mg. Se añaden 5 ml de ácido clorhídrico (HCl) 6N. En el caso de los efluentes, se adicionan 6 ml en lugar de 5, con el fin de contrarrestar la neutralización del ácido por las sales que incluye la saliva artificial. Este reactivo se prepara mediante destilación simple de una solución 1:1 de HCl de 22° Beaumé y agua destilada de grado Milli-Q, que contiene 1% (P/V) de fenol. Los tubos que contienen la muestra y el reactivo de hidrólisis se colocan, sin cerrar completamente y durante 20 minutos, en estufa de ventilación forzada y temperatura programable, a $110 \pm 1^\circ\text{C}$. Transcurrido ese tiempo, se cierran los tubos herméticamente y se mantienen en las mismas condiciones durante 24 horas.

Con el fin de cuantificar correctamente la metionina y la cisteína, que sufren una degradación superior al resto de los aminoácidos durante la hidrólisis con HCl 6N, se lleva a cabo, en otra serie de alícuotas, un proceso previo de hidrólisis por oxidación perfórmica. Mediante este proceso, la metionina se transforma en metionina sulfona y la cisteína en ácido cistéico.

Para llevar a cabo la oxidación perfórmica, se pesa una alícuota equivalente a 15 mg de proteína bruta que se coloca en un tubo Pyrex de tapón roscado. El reactivo perfórmico se prepara tomando 1 ml de agua oxigenada (H₂O₂) al 30% (v/v) y 9 ml de ácido fórmico (HCOOH) al 88%. Se disuelve, por agitación durante 30 minutos, y se enfría en baño de hielo junto con los tubos que contienen las muestras, a fin de que éstas y el reactivo alcancen la misma temperatura. Se añade 1 ml de reactivo perfórmico, se cierra el tubo y se agita, manteniéndose en baño de hielo durante 16 horas. La reacción se detiene mediante la adición de 0,4 ml/muestra de ácido bromhídrico (HBR al 48%). El exceso de reactivo se elimina mediante un sistema de evaporación al vacío en centrífuga (Gyrovap, Howe BS4402), dotado de un dedo frío para retención de residuos (Howe). La muestra, una vez oxidada, es sometida al proceso de hidrólisis de la proteína previamente descrito en este apartado.

Finalizada la hidrólisis ácida, la muestra se somete a una reacción de derivatización diluyéndose en una proporción 1:4 con agua destilada. Se filtra una alícuota a través de un filtro de membrana de celulosa de 0,45 μm de tamaño de poro (Millipore HA WP01300). Se colocan 25 μl del filtrado en un microvial de 6 mm de diámetro, se adicionan 25 μl de disolución 0,4 mM de patrón interno (DL- α -amino-adípico [AAD], Sigma A-0637) y se procede a la evaporación de la disolución en Gyrovap. Una vez que la muestra está completamente seca se le adicionan 25 μl de la mezcla de resecado que contiene metanol, agua y trietilamina (Sigma T-0886) en la proporción 2:2:1 repitiéndose, a continuación, el proceso de secado en Gyrovap. Se añaden a cada muestra 25 μl de reactivo de derivatización, preparado previamente mezclando metanol, agua, trietilamina y fenilisotiocianato en la proporción 7:1:1:1. y, tras 20 minutos de reacción a temperatura ambiente, se procede a eliminar el exceso de reactivo en Gyrovap. Una vez obtenidos los fenil-tiocarbamil-aminoácidos, se reconstituyen en 150 μl de una disolución de tampón fosfato (Pico Tag[®] Sample diluent, Waters) de pH 7,40 y 5% (v/v) de acetonitrilo, quedando así las muestras preparadas para su inyección en el cromatógrafo. La reacción de derivatización es la siguiente: $\text{PITC} + \text{AMINOÁCIDO} = \text{PITC-AMINOÁCIDO} + \text{AGUA}$

Para la separación y detección de los aminoácidos se utiliza un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), provisto de distintos componentes (PÉREZ MARTÍNEZ, 1995) en el que se instala una columna Nova Pak[®] C18 de 3,9 x 150 mm (Waters). El detector (Waters 510) se fija a 254 nanómetros. El volumen de inyección es de 10 μl , tanto para muestras como para patrones. El controlador de temperatura se mantiene a 36°C. La cuantificación de aminoácidos está basada en la integración de las áreas, mediante un estándar externo. Todos los reactivos utilizados son de grado HPLC y el agua es previamente destilada y purificada en un sistema Milli-Q, a fin de obtener agua de grado reactivo tipo I. Se inyectan cuatro estándares externos cada 16 muestras y la cuantificación de los aminoácidos se realiza a partir de la curva de calibrado que relaciona la concentración con las áreas de los patrones.

Se utilizan dos eluyentes:

Eluyente A: Se prepara una disolución con 19 g de acetato sódico trihidrato en un litro de agua de grado Milli-Q a la que se adicionan 0,5 ml de trietilamina (TEA) y 0,2 ml de EDTA (1 g/l). Se ajusta el pH de esta disolución a 6,29 adicionando ácido acético y se filtra a través de una membrana de 0,45 μm . A la disolución así preparada se le añade acetonitrilo de grado HPLC hasta que resulte un 6%, en volumen, de acetonitrilo.

Eluyente B: Es una disolución que contiene un 60%, en volumen, de acetonitrilo disuelto en agua de grado Milli-Q y 0,2 ml de EDTA (1g/l).

El gradiente formado con ambos eluyentes, impulsados por sendas bombas (Waters 510), permite la separación de los aminoácidos de hidrolizados de proteínas en menos de 12 minutos, con un flujo de 1 ml/minuto. A continuación, se procede al lavado de la columna con 100% de eluyente B y, finalmente, se restablecen las condiciones iniciales.

La tabla de gradientes utilizados es la siguiente:

Tiempo (minutos)	Flujo (ml/minuto)	% Eluyente A	% Eluyente B
0	1,0	100	0
10,0	1,0	54	46
10,5	1,0	0	100
12,0	1,5	0	100
17,0	1,0	0	100
18,0	1,0	100	0
25,0	1,0	100	0

Para la identificación y cuantificación de los aminoácidos se prepara una disolución patrón a partir de 1 ml de una disolución madre (Pierce Rockford IL-61105 USA) que contiene 17 aminoácidos en una concentración de 2,5 μ moles/ml, excepto para cisteína que cuya concentración es de 1,25 μ moles/ml. Los aminoácidos presentes en la disolución madre son L-alanina, L-arginina, L-aspartico, L-cisteína, L-glutámico, L-glicina, L-histidina, L-iso-leucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-tirosina y L-valina. La disolución se lleva a un matraz aforado de 25 ml de capacidad, enrasando con ácido clorhídrico 0,1N de grado HPLC. Solución madre para el patrón interno: se preparan 25 ml de una solución 40,05mM de alfa aminoácido (AAD), pesado con una precisión de 0,1 mg, en HCl 0,1N. A partir de ésta, se prepara la disolución que contiene el patrón en una concentración aproximada de 0,4 mM.

El método de cuantificación empleado es el de calibración multinivel con patrón interno. Para construir la recta de calibrado se toman 25 y 50 μ l de disolución 0,1mM de patrón externo y se adicionan 25 μ l de la disolución 0,4 mM de patrón interno sometiendo, a continuación, a los procesos de secado, resecado y derivatización antes descritos. Cada lote de 16 muestras va acompañado de una recta de calibración propia, preparándose tanto las muestras como los patrones, en el mismo lote.

Este procedimiento es el seguido para la detección y cuantificación de aminoácidos preparados mediante hidrólisis ácida de la muestra. Cuando se efectúa la oxidación perfórmica previa a la hidrólisis, el procedimiento es el mismo, excepto en los siguientes puntos: a) entre los aminoácidos de los patrones externos se incluyen metionina sulfona y

ácido cistéico; b) la temperatura del horno es de 32°C en lugar de 36°C; c) el pH del eluyente A es de 5,9 en lugar de 6,3.

Cuando se trata de determinar ácido diaminopimélico (DAPA), el procedimiento es también el mismo excepto que la temperatura del horno es de 49°C en lugar de 36°C y el pH del eluyente A es de 6,98 en lugar de 6,3.

3.5.6.4. Nitrógeno amoniacal.

Muestras del contenido ruminal filtrado que se inocula en los vasos de fermentación así como de los contenidos de éstos al final de cada ensayo y de sus efluentes se utilizan para la determinación del contenido en nitrógeno amoniacal (N-NH₃). El procedimiento seguido ha sido el descrito por WEATHERBURN (1967), basado en la reacción del fenol-hipoclorito. Cuando el NH₃ presente en las muestras reacciona con fenol e hipoclorito sódico se obtiene indofenol, compuesto de color azul estable que sigue la ley de Beer y cuya lectura espectrofotométrica se realiza a una longitud de onda de 625 nm, frente a una curva patrón preparada a partir de una solución madre de amonio que contiene 10 µg de nitrógeno/ml.

Se colocan 5 ml de la muestra en un tubo de centrífuga y se deja reposar en hielo durante 30 minutos, centrifugándose, a continuación a 2.700xg durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se conserva a -18°C en frascos viales hasta su posterior análisis. A 1 ml del filtrado anterior y de las disoluciones de la curva patrón se añaden 5 ml de una solución que contiene fenol (10 g/l) y nitroprusiato sódico (0,05 g/l). Tras agitar, se agregan 5 ml de solución de hipoclorito sódico (0,42 g/l) e hidróxido sódico (5 g/l). Se agita de nuevo y se incuba a 37°C durante 15 minutos antes de proceder a la lectura de su absorbancia en espectrofotómetro.

3.5.6.5. Bases púricas.

La determinación de bases púricas de las diferentes fracciones bacterianas, de los ingredientes de las dietas experimentales y de los efluentes de los fermentadores se realiza siguiendo la técnica propuesta por BALCELLS et al. (1992), con ligeras modificaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio que son: se pesan 250 mg de la muestra de los ingredientes de las dietas experimentales, 250 mg del liofilizado de los efluentes y 150 mg de la fracción bacteriana liofilizada. A continuación, se hidroliza con 2 ml de HClO₄ (2N), a una temperatura de 100 °C durante 1 hora, se enfria a temperatura ambiente, se neutraliza con NaOH (4M) utilizando la sonda del pH-metro para la medida del pH de la muestra neutralizada. Como patrón interno se utiliza alopurinol que se añade a la muestra (250 µl, 1mM) antes de su hidrólisis. Una vez eliminado el perclorato sódico por centrifugación a

3500 g durante 12 minutos, tras un mínimo de 8 horas de precipitación en refrigeración, el sobrenadante se filtra a través de un filtro (0,22 μm de tamaño de poro, Millipore, Bedford USA) y se rellena el vial para su posterior análisis en el HPLC con las siguientes condiciones:

Dos columnas Spherisorb ODS-2,5 μm (25/0,4 cm) Teknokroma, conectadas en serie.

Tampón A: disolución de fosfato de amonio 0,01M en agua Milli-Q, filtrada y desgasificada con pH 6,0

Tampón B: disolución de fosfato de amonio 0,01M en agua Milli-Q y acetonitrilo 20% v/v, filtrada y desgasificada.

Flujo: 0,8 ml/min

Gradiente:

Tiempo	flujo	%A	%B	Gradiente
Inicial	0,8	100	0	Lineal
35	0,8	0	100	Lineal
48	0,8	0	100	Lineal
50	0,8	100	0	Lineal
65	0,8	100	0	Lineal

Volumen de inyección: 10 μl

Longitud de onda del detector: 254 nM

La concentración de bases púricas en la muestra se calcula mediante siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \text{CD} / \text{CR} \times \text{A} / \text{B}$$

Siendo B = peso o volumen de la muestra (MS) sobre la que se ha añadido el alopurinol.

A = cantidad de alopurinol añadido a la muestra. 0,25ml (8mMolar) = 2 μmoles

Patrón: (coeficiente de respuesta, CR)

$$\text{CRgn} = \text{área gn} / \text{área al}$$

$$\text{CRad} = \text{área ad} / \text{área al}$$

Muestra problema: (coeficiente de determinación, CD)

$$\text{CDg} = \text{área gn} / \text{área al}$$

$$\text{CDad} = \text{área ad} / \text{área al}$$

gn (guanina)

ad (adenina)

al (alopurinol).

3.5.7. Determinación del pH.

El pH del filtrado del contenido ruminal que se utiliza como inóculo en los fermentadores así como del contenido de los fermentadores a lo largo cada ensayo, se

determina por lectura en pH-metro (Metrohm 691), dotado de sonda y adaptado para mediciones de pH entre 0 y 14 y temperaturas entre 0 y 80°C. El pH del contenido de los fermentadores se registró dos veces al día, antes del suministro de alimento, por la mañana y por la tarde.

3.5.8. Ácidos grasos volátiles.

La determinación de la concentración en ácidos grasos volátiles totales (AGVs) y de las proporciones individuales de acético, propiónico, isobutírico, n-butírico, isovalérico, n-valérico y caproico, se lleva a cabo en muestras del contenido ruminal de los animales donadores del inóculo, de los contenidos de los frascos de fermentación al final de los ensayos y de sus efluentes.

Se sigue la técnica de JOUANY (1982), con ligeras modificaciones, utilizando un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Autosystem (Perkin-Elmer Cor., Norwalk, CT), provisto de un detector de ionización de llama (FID). La determinación se realiza utilizando muestras filtradas, a través de un filtro de membrana de las mismas características que los que se describen en el apartado 3.5.6.3. Se colocan 3 ml de la muestra fijada como se describe anteriormente en un tubo de centrifuga y se añaden 0,7 ml de ácido metafosfórico al 25% p/v; se agita y se deja reposar en hielo durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se centrifuga a 2.700xg durante 20 minutos a 4°C y se introduce el sobrenadante en viales de inyección, cerrados herméticamente.

Para la separación cromatográfica de los distintos ácidos grasos se emplea una columna capilar Tracer Analítica de fase Tracsil TR-Wax (PEG entrecruzado) de 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 μ m film (Tecknokroma, Barcelona). La temperatura inicial es de 120°C y aumenta con un gradiente de 10°C/min, hasta alcanzar los 180°C. El tiempo total empleado en cada determinación es, por tanto, de 6 minutos. La temperatura seleccionada para el inyector fue de 250°C y de 300°C para el detector. La presión en cabeza del gas portador se ajusta a 14 PSI. El volumen de inyección de la muestra es de 2 μ l.

La cuantificación se lleva a cabo utilizando un estándar externo. El calibrado se realiza mediante la inyección de patrones de los ácidos grasos objeto de estudio, preparados a distintas concentraciones, en una solución de ácido metafosfórico de igual concentración a la resultante en las muestras problema a inyectar (7,15% p/v). Se utilizan cuatro niveles de calibración y, al menos, dos réplicas por nivel. Los picos con área menor del 0,1% se desechan por situarse por debajo del límite de detección de la técnica.

3.5.9. Extracción de taninos condensados.

La determinación del contenido en las distintas fracciones de taninos condensados (TC): libres (TCL), ligados a la fibra (TCF) y ligados a la proteína (TCP) se realiza en muestras de las dietas experimentales, sus ingredientes, contenidos de los fermentadores y de los efluentes. Se sigue el procedimiento desarrollado por TERRIL *et al.* (1992), con una serie de modificaciones propuestas por PÉREZ MALDONADO y NORTON (1996).

El procedimiento consta de dos fases. Una primera en la que se obtienen, de forma secuencial a partir de una misma muestra, los extractos de cada fracción y, una segunda, en la que se realiza la cuantificación, por análisis espectrofotométrico (espectrofotómetro de haz de luz simple y cubeta de cuarzo), de los taninos condensados mediante la reacción que se produce con una solución de butanol-HCl.

3.5.9.1. Extracción de los taninos condensados libres.

Se pesan 300 mg de la muestra en tubos de vidrio de 50 ml provistos de tapón de rosca. Se añaden 20 ml de una solución de acetona que contiene 700 ml de acetona, 300 ml de agua destilada y 1 gramo de ácido ascórbico/l. Se agitan los tubos y se desgasifica con N₂. Se llevan a una rueda mezcladora en la que se dejan agitar durante 150 minutos, repitiéndose el proceso dos veces más. Una vez finalizada la extracción con la solución de acetona, se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos, se recoge el sobrenadante y se guarda el residuo sólido para posteriores extracciones. Se elimina la acetona del sobrenadante en rotavapor (40 °C máximo) hasta que el volumen se reduce a unos 7 ml. Se trasvasa la solución remanente a un tubo de vidrio de 20 ml, enjuagándose los restos con éter dietílico. Se mezcla esta solución con un volumen igual de éter dietílico, agitándose vigorosamente y se deja reposar unos minutos hasta que se produzca una separación de las fases. Se descarta la capa superior del solvente en la que se encuentran disueltos los pigmentos, mediante aspiración con pipeta Pasteur, repitiéndose el proceso dos veces más. Los taninos condensados libres, solubles en el agua, permanecen en la capa inferior, a la que se añade un volumen igual de acetato de etilo. Se agita y se observa de nuevo la separación de fases. La capa superior, de acetato de etilo, donde se encuentran disueltos los lípidos y fenoles de bajo peso molecular se elimina por aspiración. Se repite el proceso en el rotavapor con la capa inferior para eliminar cualquier traza del solvente y reducir el volumen total a unos 5-6 ml. Se lleva a un volumen de 10 ml con metanol (800ml/l). Este extracto final representa la fracción de los taninos condensados libres y se almacena a 4°C hasta su posterior análisis.

3.5.9.2. Extracción de los taninos condensados ligados a la proteína.

El residuo de la extracción descrita en el apartado anterior se deseca a 60°C durante 12 horas. Se añaden 5 ml de una solución (SDS) que contiene 10 g/l de sodio dodecyl sulfato, 50 g/l de trietanolamina y 10 g/l de 2-mercaptoetanol. Se cierran los tubos firmemente, se agitan y se colocan en un baño de agua a 100°C durante 75 minutos. Pasado este tiempo, se enfrían los tubos a temperatura ambiente, se mezclan y se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se separa por aspiración con pipeta Pasteur y representa la fracción de los taninos condensados ligados a la proteína. Este extracto se lleva a un volumen de 10 ml con la solución de SDS y se almacena a 4 °C hasta su posterior análisis.

3.5.9.3. Extracción de los taninos condensados ligados a la fibra.

El residuo de la extracción con SDS se lava, se le añaden 5 ml de metanol (800 ml/l) y se centrifuga dos veces, a 3000 rpm durante 10 minutos. La cantidad de taninos presentes en este residuo representa la fracción de taninos condensados ligados a la fibra.

3.5.9.4. Análisis espectrofotómetro de los taninos condensados.

Se sigue el procedimiento descrito por HAGERMAN y BUTLER (1991).

Para la determinación de los taninos condensados libres y ligados a la fibra, el solvente utilizado es el metanol al 80 %, mientras que para la de los taninos ligados a la proteína se utiliza la solución de SDS.

Para obtener las rectas de calibración (una para los taninos libres y ligados a la fibra y otra distinta para taninos ligados a la proteína) se utiliza polvo de quebracho.

Para la cuantificación de los taninos condensados libres y de los ligados a la proteína se añaden 250 μ l del extracto a 5 ml del reactivo butanol-HCl (700 mg de sulfato ferroso heptahidrato en 50 ml de HCl concentrado -37-38%- y se llevan a un volumen de 1 litro con butan-1-ol) utilizándose tubos de vidrio, provistos de tapón de rosca y previamente identificados. Los tubos se cierran ligeramente y se agitan vigorosamente. Si en esta fase aparece una coloración rosácea, se lee la absorbancia a 550 nm y se sustrae del valor final.

Se colocan los tubos, en un baño con agitación, a 100°C durante 75 minutos y una vez finalizado el proceso, se dejan enfriar. Se pone a cero el espectrofotómetro empleando únicamente el reactivo como blanco. Tanto el blanco como las muestras problema se

colocan en una cubeta de cuarzo. Se lee la absorbancia a 550 nm, tras haber agitado la muestra para asegurar la mezcla adecuada del extracto añadido.

Para la determinación de los taninos condensados ligados a la fibra, se añaden 15 ml del reactivo butanol-HCl directamente sobre el residuo y se mantienen los tubos en un baño de agua en ebullición durante 75 minutos. Pasado este tiempo, se dejan enfriar, se centrifugan durante 15 minutos y se lee la absorbancia en el espectrofotómetro, siguiendo las mismas indicaciones que para las determinaciones de taninos condensados libres y ligados a la proteína.

3.6. CÁLCULO DE LOS AAT Y PBV.

En el Sistema Escandinavo de Valoración Proteica de Alimentos para Rumiantes, se utilizan los valores de AAT y PBV como índices de la capacidad de un alimento para atender a las necesidades del animal y de los microorganismos ruminales, respectivamente.

AAT (g/kg MS): cantidad de aminoácidos disponibles en intestino delgado.

PBV (g/kg MS): balance proteico en el rumen

Se expresan mediante valores constantes o variables, que pueden relacionarse con los análisis de los alimentos:

$$\text{AAT} = [\text{PB} \cdot (1 - \text{DE}) \cdot \text{AANDR} \cdot \text{DIPNDR}] + (\text{PM} \cdot \text{AAPM} \cdot \text{DIPM})$$

$$\text{PBV} = (\text{PB} \cdot \text{DE}) - \text{PM}$$

Siendo PB: contenido en proteína bruta del alimento, g/kg MS

DE: degradabilidad efectiva de la proteína bruta en el rumen, %

AANDR: contenido en aminoácidos de la proteína del alimento no degradada en el rumen, %.

DIPNDR: digestibilidad intestinal de la proteína del alimento no degradada en el rumen, %.

PM: proteína microbiana producida en el rumen, g/kg MS.

AAPM: contenido en aminoácidos de la proteína microbiana sintetizada en el rumen, %.

DIPM: digestibilidad intestinal de la proteína microbiana sintetizada en el rumen.

3.7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

Los valores obtenidos para las distintas variables fueron analizados estadísticamente en un ordenador compatible tipo PC. Se utilizó el programa estadístico Statgraphics® Plus para Windows® versión 4.0 (Statistical Graphics Corp., 1994-1999)

Los análisis estadísticos realizados fueron los siguientes:

- Análisis de regresión (Statgraphics) para determinar las ecuaciones de regresión lineal ($Y = A + B \cdot X$) entre los parámetros *in vitro* e *in vivo*.
- Análisis de la varianza de una vía (Statgraphics) para establecer la significación del efecto de la especie animal para cada dieta, o de la dieta, para cada especie. Las diferencias entre grupos se obtuvieron mediante el Test de Bonferroni.
- Análisis de la varianza multifactorial (Statgraphics) para el estudio conjunto de la significación del efecto de la especie, dieta consumida e interacción de ambos factores. Las diferencias entre grupos se obtuvieron mediante el Test de Bonferroni.

Para el cálculo de las variables que caracterizan el perfil de la degradación ruminal de la materia seca y de la proteína bruta de los distintos alimentos, se ajustaron los valores de degradación mediante el procedimiento NLIN (Nonlinear Regresión) del programa estadístico SAS (SAS, 1989) al modelo propuesto por Ørskov y McDonald (1979).

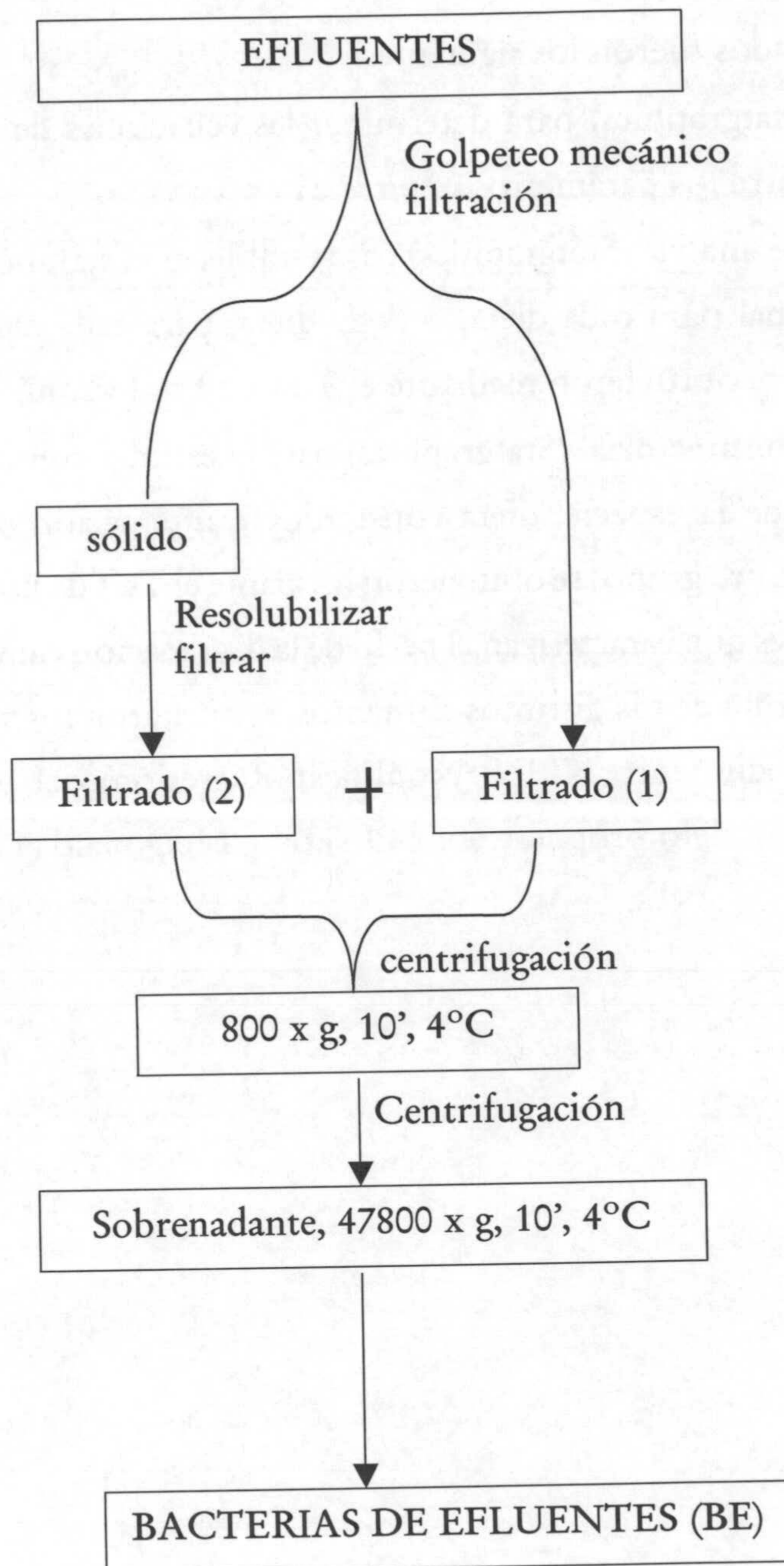


Figura 3: Esquema de aislamiento de bacterias de efluentes

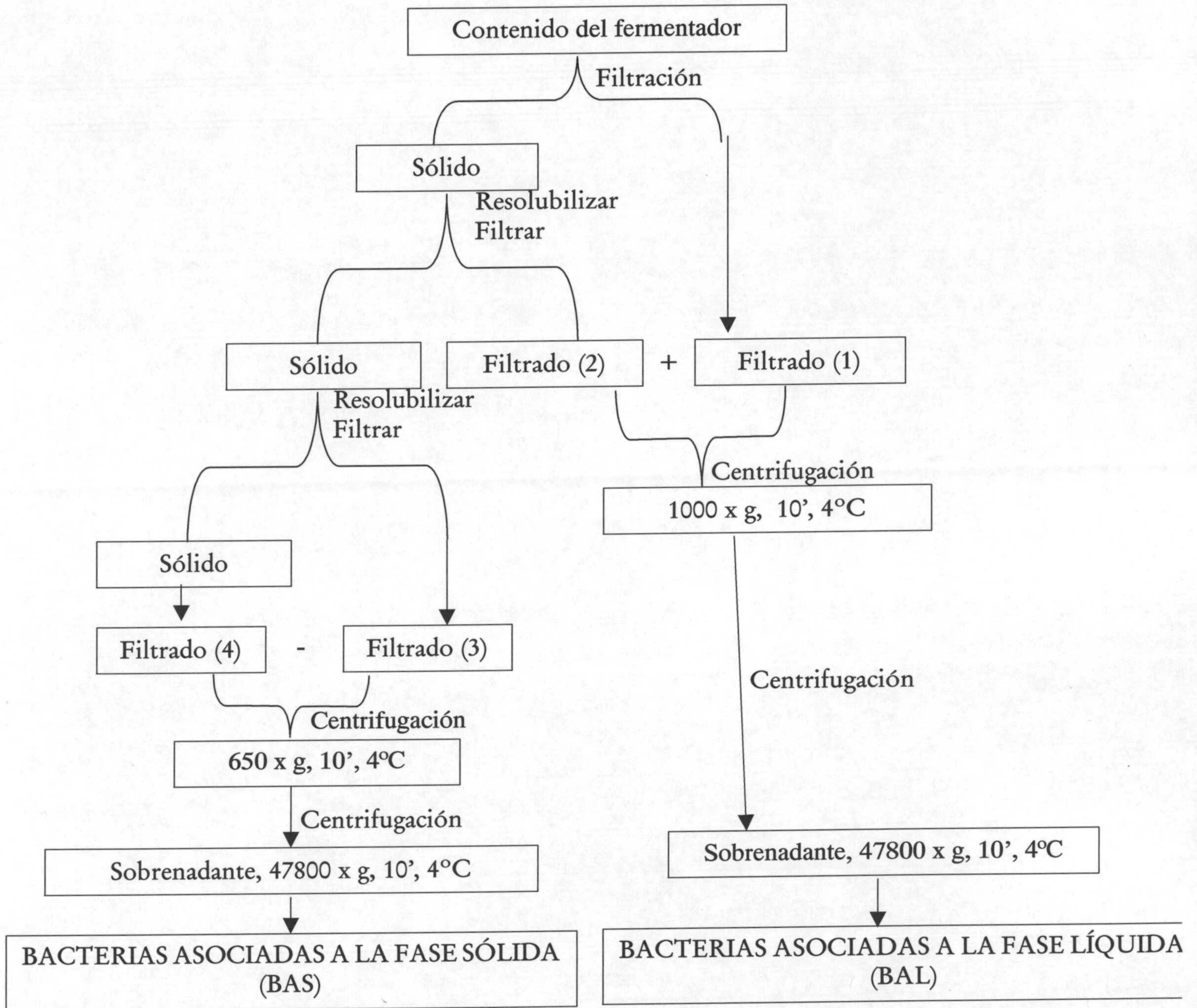


Figura 4: Esquema de aislamiento de bacterias de los contenidos de los fermentadores

4. RESULTADOS.

4. RESULTADOS.

4.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA.

4.1.1 Orujo de dos fases y hoja de olivo.

La composición química del orujo de dos fases y de la hoja de olivo utilizados en el presente trabajo aparece en la Tabla 3. Los dos subproductos son ricos en paredes celulares (FND 63,2 y 39,9 g/100 g MS, respectivamente para el orujo y la hoja) y en componentes lignocelulósicos (FAD 43,0 y 25,5 g/100 g MS, respectivamente para el orujo y la hoja) siendo los valores de LAD de 23,6 y 14,1 g/100 g MS, respectivamente para el orujo y la hoja.

El contenido en nitrógeno total es muy bajo (1,58 y 1,26 g/ 100g MS para el orujo y la hoja, respectivamente) y una gran parte de este nitrógeno se encuentra asociada a la fracción de lignocelulosa (47,0 y 45,0 g/100 g Nt, respectivamente para el orujo y la hoja).

El contenido en bases púricas totales es más elevado en la hoja de olivo que en orujo de dos fases (14,4 frente a 5,04 μ moles/g MS).

Tanto el orujo de aceituna como la hoja de olivo incluyen taninos condensados totales (TCT), siendo los valores más elevados en el orujo (37,3 y 11,1 mg/g MS, respectivamente para el orujo y la hoja). El total de taninos condensados se distribuye en las siguientes fracciones: taninos condensados libres (TCL) 4,64 y 3,53mg/g MS; taninos condensados ligados a la fibra (TCF) 13,5 y 6,35 mg/g MS y taninos condensados ligados a la proteína (TCP) 19,2 y 1,25 mg/g MS, respectivamente en el orujo y en la hoja.

Tabla 3. Composición química del orujo de aceituna de dos fases (ODF) y de la hoja de olivo (HO).

	ODF	HO
MS, g/100g MF	87,6	94,0
g/100g MS		
MO	88,9	89,0
EE	0,25	8,03
FND	63,2	39,9
FAD	43,0	25,5
LAD	23,6	14,1
Nt	1,58	1,26
NFAD, g/100g Nt	47,0	45,0
EB, MJ/kg MS	18,9	21,1
μmol/g		
Adenina	0,593	4,26
Guanina	4,44	10,1
Total bases púricas	5,04	14,4
mg/g MS		
TCL	4,64	3,53
TCF	13,5	6,35
TCP	19,2	1,25
TCT	37,3	11,1

La composición aminoacídica de la proteína del orujo de dos fases y de la hoja de olivo aparece en la Tabla 4. El contenido en nitrógeno aminoacídico total es de 86,1 y 66,3 g/100 g Nt, respectivamente para el orujo y la hoja, con elevadas proporciones de arginina, alanina, glicina y glutámico en la hoja (10,9, 5,63, 5,37 y 5,15 g N-aa/100 g Nt, respectivamente) y en leucina, alanina, valina y lisina en el orujo (10,4, 8,81, 8,21 y 6,66 g N-aa/100 g Nt, respectivamente). Los aminoácidos limitantes en estos subproductos pueden ser metionina, cisteína o tirosina (0,38 y 1,34, 0,46 y 0,98 y 1,79 y 1,78 g Naa/100 g Nt para hoja y orujo, respectivamente).

Tabla 4. Composición aminoacídica del orujo de dos fases (ODF) y de la hoja de olivo (HO).

	ODF		HO	
	g N-aa/100g Nt	g/kg MS	g N-aa/100g Nt	g/kg MS
Aspártico	2,43	3,17	4,78	5,75
Glutámico	5,48	7,22	5,15	6,81
Serina	4,12	3,91	3,79	3,58
Glicina	5,98	3,82	5,37	3,62
Histidina*	3,76	1,78	3,43	1,60
Arginina*	7,34	3,01	10,9	4,27
Treorina*	3,78	4,02	3,36	3,60
Alanina	8,81	7,21	5,63	4,51
Prolina	5,21	5,34	3,67	3,80
Tirosina	1,78	2,81	1,79	2,91
Valina*	8,21	9,02	3,70	3,90
Metionina*	1,34	2,12	0,38	0,50
Cisteina	0,98	1,11	0,46	0,51
Isoleucina*	4,83	5,77	3,84	4,53
Leucina*	10,4	13,5	4,15	4,89
Fenilalanina*	4,99	7,56	2,63	3,91
Lisina*	6,66	4,76	3,29	2,16
Esenciales*	51,3	51,5	35,7	29,4
No esenciales	34,8	34,6	30,6	31,5
Totales	86,1	86,1	66,3	60,9

*: aminoácidos esenciales

4.1.2. Otros ingredientes de las dietas experimentales.

La composición química de otros ingredientes de las dietas experimentales ensayadas aparece en la Tabla 5. El concentrado (CO), constituido por 1/3 de orujo de dos fases, extractado y desecado y 2/3 de cebada grano, presenta un contenido medio en paredes celulares (FND 37,8 g/100 g MS) y bajo en FAD (15,8 g/100 g MS) y, sobre todo, en LAD (5,63 g/100 g MS). Su contenido en nitrógeno es bajo (1,88 g /100 g MS) y una parte del mismo se encuentra ligada a la FAD (14,8 g/100 g Nt).

En cuanto al heno de alfalfa (HA), la composición de sus paredes celulares (FND: 39,0; FAD: 24,6 y LAD: 4,78 g/100g MS) es muy parecida a la de la hoja de olivo. Su contenido en nitrógeno total es relativamente elevado (2,93 g/100g MS) y baja la proporción de nitrógeno que se presenta asociado a la FAD (7,68 g/100 Nt).

Los contenidos en paredes celulares así como la composición de estas en las habas y en la cebada son bastante similares (FND 27,5 y 26,3; FAD 8,90 y 6,74 y LAD 1,50 y 1,32 g/100g MS, respectivamente para las habas y la cebada). Sin embargo, mientras que el contenido en nitrógeno total es bajo para la cebada, resulta muy alto para las habas (1,64 y 4,49 g/100g MS, respectivamente).

La composición en bases púricas totales es de 26,4; 16,9, 10,0 y 8,36 $\mu\text{mol/g MS}$, para el HA, las habas, el CO y la cebada, respectivamente.

En cuanto a las distintas fracciones de taninos condensados, es de destacar las concentraciones más elevadas de TCL corresponden a las habas (22,7 mg/g MS) y a la cebada (8,53 mg/g MS). Las concentraciones más elevadas de TCF corresponden al concentrado (1,55 mg/g MS) y al HA (1,01 mg/g MS). Los TCP presentan una concentración claramente más elevada en las habas (4,02 mg/g MS) siendo para los otros ingredientes menor y muy similar (entre 2 y 3 mg/g MS).

Tabla 5. Composición química del heno de alfalfa (HA), del concentrado (CO), de la cebada grano y de las habas.

Ingrediente:	HA	CO	Cebada	Habas
MS, g/100g MF	91,2	90,0	91,2	88,0
	g/100g MS			
MO	88,2	94,1	97,5	96,2
EE	1,76	1,75	1,99	0,78
FND	39,0	37,8	26,3	27,5
FAD	24,6	15,8	6,74	8,90
LAD	4,78	5,63	1,32	1,50
Nt	2,92	1,88	1,64	4,49
NFAD, g/100g Nt	7,68	14,8	5,20	2,45
Nt- NFAD, g/100g MS	2,69	1,60	1,55	4,38
EB, MJ/kg MS	17,8	18,6	21,1	18,9
	$\mu\text{mol/g}$			
Adenina	7,94	2,66	2,37	6,15
Guanina	18,5	7,35	5,99	10,8
Total bases púricas	26,4	10,0	8,36	16,9
	mg/g MS			
TCL	1,09	3,54	8,53	22,7
TCF	1,01	1,55	0,18	0,36
TCP	2,81	2,20	2,01	4,02
TCT	4,90	7,31	10,7	27,1

La composición aminoacídica del CO y del HA aparece en la Tabla 6. Destacan el alto contenido en glutámico, prolina, arginina y glicina que aparece en el concentrado (9,39; 7,28; 7,23 y 3,83 g N-aa/100 g Nt, respectivamente) y en prolina, lisina y glutámico que presenta el heno de alfalfa (12,7; 8,58 y 8,01 g N-aa/100 g Nt, respectivamente). En la Tabla 7 aparece la composición en aminoácidos de las proteínas de las habas y de la cebada. Para las habas hay que destacar el alto contenido en arginina, glutámico, aspártico y lisina (19,5; 10,1; 8,27 y 6,63 g N-aa/100 g Nt, respectivamente) y en la proteína de la cebada

destacan los elevados contenidos en glutámico, arginina y prolina (12,6; 11,1 y 8,83 g N-aa/100 g Nt, respectivamente).

Tabla 6. Composición aminoacídica del heno de alfalfa (HA) y del concentrado (CO).

	HA		CO	
	g N-aa/100g Nt	g/kg MS	g N-aa/100g Nt	g/kg MS
Aspártico	13,8	39,1	3,34	6,12
Glutámico	8,01	24,1	9,39	18,8
Serina	5,89	12,8	3,74	5,36
Glicina	7,46	11,4	3,83	3,96
Histidina*	4,42	4,79	1,03	0,72
Arginina*	12,8	11,4	7,23	4,30
Treorina*	3,93	9,61	1,92	3,15
Alanina	6,47	11,7	3,15	3,86
Prolina	12,7	30,2	7,28	11,6
Tirosina	2,17	7,97	0,95	2,34
Valina*	4,76	11,4	2,66	4,28
Metionina*	0,61	1,83	0,36	0,73
Cisteina	0,90	2,33	1,16	1,90
Isoleucina*	3,23	8,67	1,59	2,86
Leucina*	6,32	17,0	3,34	6,03
Fenilalanina*	2,98	10,1	1,72	3,89
Lisina*	8,58	13,1	2,86	2,85
<i>Esenciales*</i>	47,6	87,8	22,7	28,8
<i>No esenciales</i>	57,4	140	32,8	53,9
Totales	105	227	55,6	82,7

*: aminoácidos esenciales

Tabla 7. Composición aminoacídica de las habas y de la cebada.

	Habas		Cebada	
	g N-aa/100g Nt	g/kg MS	g N-aa/100g Nt	g/kg MS
Aspártico	8,27	35,5	3,27	5,13
Glutámico	10,1	47,8	12,6	21,7
Serina	3,97	13,4	3,68	4,52
Glicina	4,91	11,8	5,20	4,57
Histidina*	3,60	5,97	3,19	1,93
Arginina*	19,5	27,2	11,1	5,63
Treorina*	2,47	9,43	2,62	3,66
Alanina	5,08	14,5	4,32	4,51
Prolina	3,23	11,9	8,83	11,9
Tirosina	2,10	12,2	1,01	2,13
Valina*	3,10	11,6	3,55	4,87
Metionina*	0,35	1,69	0,75	1,31
Cisteina	0,50	1,94	0,90	1,27
Isoleucina*	2,58	10,8	2,31	3,55
Leucina*	3,83	16,1	3,38	5,19
Fenilalanina*	2,06	10,9	2,39	4,62
Lisina*	6,63	15,5	3,88	3,32
Esenciales*	44,1	109	33,1	34,1
No esenciales	38,2	149	39,8	55,7
Totales	82,3	258	72,9	89,8

*: aminoácidos esenciales

4.2. DIGESTIBILIDAD INTESTINAL DE LA PROTEÍNA NO DEGRADADA EN EL RUMEN.

Los valores correspondientes a la degradabilidad ruminal de la proteína bruta (DRPB %), tras 16 y 48 horas de incubación en el rumen de ovino y de caprino, la digestibilidad intestinal *in vitro* de la proteína no degradada en el rumen (DIPNDR, %) y la digestibilidad total de la proteína bruta (DTPB, %) del orujo de aceituna de dos fases de las campañas (1997 y 1999), de la hoja de olivo sometida a distintos tratamientos, del concentrado sometido a distintos tratamientos y del heno de alfalfa, aparecen en la Tabla 8. Los parámetros DRPB, DIPNDR y DTPB tras 16 horas de preincubación en el rumen del animal son, en general, bajos si se comparan con los obtenidos tras 48 h de preincubación tanto para el orujo como para la hoja de olivo, aunque existen también diferencias entre campañas para el orujo de dos fases. El ODF de la campaña 99 muestra valores de la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen superiores al del orujo procedente de la campaña de 1997, mientras que el ODF de 1997 muestra mayor degradabilidad ruminal de la proteína bruta. El calentamiento de la hoja de olivo a 60°C parece aumentar el valor del parámetro DRPB (70,6 y 56,8 de la hoja calentada a 60°C para

caprino y ovino, respectivamente) y de DTPB (82,8 y 72,1 para caprino y ovino, respectivamente). Sin embargo, el tratamiento con el calor disminuye el valor de DIPNDR (41,6 y 35,4 de la hoja calentada a 60°C para caprino y ovino, respectivamente). La hoja de olivo de limpia tratada con PEG presenta valores de DRPB más bajos que los de la hoja desecada a 60°C. El concentrado y el heno de alfalfa presentan los valores de DRPB, DIPNDR y DTPB más elevados; incluso los valores de DTPB para el heno de alfalfa llegan a rozar el 100% para ambas especies (99,2 %). La adición del PEG mejora sólo el valor de DRPB de la hoja de olivo; sin embargo, tanto la DIPNDR como la DTPB de la hoja de limpia y del concentrado no parecen mejorar por el tratamiento con PEG.

En general, los parámetros estimados muestran valores muy similares cuando las muestras se incuban en el rumen de caprino y de ovino, durante 16 horas. Para los distintos tipos de hojas, caprino muestra mayor capacidad degradativa en el rumen que ovino. Estas diferencias interespecíficas se diluyen al prolongarse el tiempo de incubación hasta 48 horas.

Tabla 8. Degradabilidad ruminal (DRPB, %), digestibilidad intestinal *in vitro* de la proteína no degradada en rumen (DIPNDR, %) y digestibilidad total (DTPB, %) de la proteína bruta del orujo de aceituna de dos fases procedente de distintas campañas, de la hoja de olivo desecada a distintas temperaturas, del concentrado y del heno de alfalfa tras su incubación en rumen de caprino (C) y de ovino (O) durante 16 o 48 horas.

Tiempo de incubación	EA	16 H			48 H		
		DRPB	DIPNDR	DTPB	DRPB	DIPNDR	DTPB
ODF 1997	O	79,9	38,5	87,6	83,4	45,6	91,0
	C	76,7	35,3	84,9	83,7	48,0	91,5
ODF 1999	O	46,1	42,1	68,8	60,6	41,6	77,0
	C	50,0	41,5	71,0	62,5	42,5	78,4
Hoja de olivo* (T ^a . ambiente)	O	36,5	34,5	58,4	74,5	53,3	88,1
	C	55,4	46,8	76,3	81,0	58,9	92,2
Hoja de olivo* (60 °C)	O	56,8	35,4	72,1	82,7	55,2	92,2
	C	70,6	41,6	82,8	84,4	55,2	93,0
Hoja de olivo** (T ^a ambiente)	O	25,0	51,3	63,5	-	-	-
	C	39,3	53,1	71,5	-	-	-
Concentrado	O	83,0	84,1	97,3	-	-	-
	C	87,6	80,6	97,6	-	-	-
Hoja de olivo* +PEG***	O	63,6	52,5	62,7	-	-	-
	C	58,7	51,3	72,3	-	-	-
Concentrado +PEG***	O	69,7	84,8	97,9	-	-	-
	C	73,2	82,3	96,6	-	-	-
Heno de alfalfa	O	88,4	92,8	99,2	-	-	-
	C	89,3	92,7	99,2	-	-	-

EA: especie animal; ODF 1997: orujo de dos fases, campaña 1997; ODF 1999: orujo de dos fases, campaña 1999; *: hoja de poda; **: hoja de olivo de limpia de almazara. Entre paréntesis se indica la temperatura de desecación; ***: 2g PEG/100g de MS del alimento; O: ovino; C: caprino.

4.3. CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN EN EL FERMENTADOR.

4.3.1. Degradabilidad de la materia seca y de la proteína bruta de los distintos ingredientes de las dietas experimentales en fermentadores de flujo continuo.

Los valores correspondientes a los perfiles de degradación de la materia seca y de la proteína bruta del heno de alfalfa, incubado en los fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino y alimentados con heno de alfalfa, aparecen en la Tabla 9. La fracción rápidamente degradable (*a*) de la MS y de la PB se afecta significativamente ($P < 0,01$ y $P < 0,001$, respectivamente) por la especie animal de la que procede el inóculo ruminal, siendo mayor cuando este procedía de ovino que de

caprino. La fracción potencialmente degradable (*b*) de la MS es significativamente mayor ($P < 0,01$) en fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino. Para la PB, el efecto del origen del inóculo no es significativo ($P > 0,05$), pero existe una tendencia a presentar valores superiores cuando la incubación se realiza en fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino, en comparación con ovino. La velocidad de degradación (*c*) de la fracción (*b*) de la MS y de la PB presenta valores significativamente ($P < 0,01$ y $0,05$, respectivamente) superiores cuando la muestra se incubaba en fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino. La degradabilidad potencial (DP) de la MS es mayor ($P < 0,05$) en fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino y la de la PB no muestra diferencias significativa ($P > 0,05$) achacables al origen del inóculo ruminal. La degradabilidad efectiva (DE) de la PB muestra diferencias significativas ($P < 0,01$) siendo superior cuando las muestras se incubaban en fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino en comparación con ovino. Sin embargo, los valores correspondientes a la MS no difieren ($P > 0,05$) aunque si muestran una tendencia a ser superiores en los fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino.

Tabla 9. Características de la degradación de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) del heno de alfalfa obtenidas en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino y alimentados con heno de alfalfa. Efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal.

	<i>a</i> , %	<i>b</i> , %	<i>c</i> , h ⁻¹	DP, %	DE, %
DMS					
Ovino	48,2 ^a	27,3 ^a	0,020 ^a	75,5 ^a	56,8
Caprino	45,5 ^b	32,5 ^b	0,031 ^b	78,1 ^b	59,2
SE	**	**	**	*	NS
DPB					
Ovino	61,2 ^a	29,5	0,034 ^a	90,7	74,2 ^a
Caprino	58,6 ^b	31,6	0,044 ^b	90,2	74,7 ^b
SE	***	NS	*	NS	**

a: fracción rápidamente degradable; *b*: fracción potencialmente degradable; *c*: velocidad de degradación de la fracción *b*; DP = $a+b$: degradabilidad potencial; DE, % = $a + (b*c)/(c+k)$: degradabilidad efectiva, $k = 0,042$ para ovino y caprino (calculado a partir del flujo de la saliva artificial en los fermentadores); SE: significación estadística; NS: no significativo ($P > 0,05$); *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; las letras en superíndice, en una misma columna, representan diferencias significativas para cada valor debidas al efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal.

Los valores correspondientes a los perfiles de degradación de la materia seca y de la proteína bruta del heno de alfalfa (HA), del concentrado (CO) y de la dieta experimental mezcla (HACO), obtenidos en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino y alimentados con la dieta HACO aparecen en la Tabla 10.

Los valores no se ven afectados ($P > 0,05$) con excepción de la fracción *a* de la PB de las dietas HA y HACO, significativamente ($P < 0,05$) superiores en fermentadores inoculados con líquido ruminal de ovino y caprino, respectivamente. La DE de la MS de la dieta HACO es significativamente ($P < 0,001$) superior con inóculo ruminal de caprino y la de la PB lo es ($P < 0,001$) con inóculo de ovino. En general, los parámetros de la degradación ruminal del concentrado tienden a ser mayores en fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino aunque no muestran diferencias significativas ($P > 0,05$). La interacción “especie animal x alimento” sólo es significativa para los parámetros *b* y DP de la MS ($P < 0,05$).

Tabla 10. Características de la degradación de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) del heno de alfalfa (HA), del concentrado (CO) y de la dieta HACO, obtenidas en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino y alimentados con la dieta HACO. Efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal y del tipo de alimento incubado.

Alimento incubado	HA			CO			HACO			E	A	ExA	EEM	
	Ovino	Caprino	SE	Ovino	Caprino	SE	Ovino	Caprino	SE					
<i>a</i> , %	DMS	44,8	43,3	NS	62,2	62,7	NS	53,7	54,2	NS	NS***	NS	0,144	
	DPB	58,9 ^a	58,2 ^b	*	65,0	65,4	NS	64,3 ^a	65,2 ^b	*	NS***	NS	0,183	
<i>b</i> , %	DMS	31,1	22,2	NS	14,4	18,6	NS	12,4	12,8	NS	NS***	*	0,983	
	DPB	27,7	17,6	NS	19,9	21,7	NS	16,2	13,8	NS	NS*	NS	1,069	
<i>c</i> , h ⁻¹	DMS	0,010 ^a	0,031 ^b	*	0,067	0,115	NS	0,032	0,042	NS	NS*	NS	0,009	
	DPB	0,020	0,041	NS	0,054	0,045	NS	0,052	0,050	NS	NSNS	NS	0,004	
DP, %	DMS	75,9	65,6	NS	76,6	81,3	NS	66,1	67,1	NS	NS***	*	1,024	
	DPB	86,6	75,9	NS	85,0	87,1	NS	80,5	79,0	NS	NSNS	NS	1,074	
DE, %	DMS	52,2	54,4	NS	62,1	74,9	NS	60,2 ^a	61,3 ^b	***	*	***	NS	1,021
	DPB	68,7	68,7	NS	76,6	78,5	NS	74,7 ^a	73,7 ^b	***	NS***	NS	0,395	

HACO: heno de alfalfa + concentrado; *a*: fracción rápidamente degradable; *b*: fracción potencialmente degradable; *c*: velocidad de degradación de la fracción *b*; DP = *a*+*b*: degradabilidad potencial; DE, % = $a + (b*c)/(c+k)$: degradabilidad efectiva, $k = 0,028$ para ovino y caprino (calculado a partir del flujo de la saliva artificial en los fermentadores); SE: significación estadística; NS: no significativo ($P > 0,05$); *: $P < 0,05$; ***: $P < 0,001$; E: efecto de la especie animal; A: efecto del tipo de alimento incubado; ExA: interacción entre la especie animal donadora del inóculo ruminal y el tipo de alimento incubado; las letras en superíndice, en una misma fila y para un mismo alimento, representan diferencias significativas para cada valor, debidas al efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal; EEM: error estándar de la media.

En la Tabla 11 aparecen los parámetros de la degradabilidad de la MS y de la PB del heno de alfalfa, del concentrado y de la dieta HACO obtenidos en fermentadores alimentados con esta dieta y tratada con PEG (dieta HACOP).

El efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal que se emplea en los fermentadores es significativo para los valores de la fracción potencialmente degradable (b) y para la DP de la MS y de la PB; para la velocidad de degradación (c) de la PB ($P < 0,01$) del heno de alfalfa y para la velocidad de degradación (c) de la PB del concentrado y de la dieta HACO ($P < 0,05$). Los otros parámetros no muestran diferencias significativas ($P > 0,05$) aunque las velocidades de degradación del heno de alfalfa y del concentrado muestran tendencia a ser superiores en los fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino. La velocidad de degradación de la dieta HACO es, sin embargo, superior en aquellos fermentadores inoculados con líquido ruminal de ovino. La DE muestra una tendencia a ser mayor cuando el inóculo procede de ovino, con excepción de la de la PB del HA. En general, el efecto del tipo de alimento incubado (A) muestra mayor significación que el de la especie animal (E) donadora del inóculo. La interacción "especie animal x tipo de alimento" es significativa para los valores de (b) de la MS ($P < 0,05$), (c) de la PB ($P < 0,001$) y para DP de la MS y PB ($P < 0,05$).

Tabla 11. Características de la degradación de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) del heno de alfalfa (HA), del concentrado (CO) y de la dieta HACO, obtenidas en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino alimentados con la dieta HACOP. Efecto de la especie animal donadora del inoculo ruminal y del tipo de alimento incubado.

Alimento incubado		HA			CO			HACO			EEM			
Especie animal		Ovino	Caprino	SE	Ovino	Caprino	SE	Ovino	Caprino	SE	E	A	ExA	
a, %	DMS	35,1	34,5	NS	49,2	49,2	NS	40,7	41,2	NS	NS	***	NS	0,186
	DPB	51,6	52,5	NS	44,7	44,1	NS	50,0	52,1	NS	NS	***	NS	0,297
b, %	DMS	39,5 ^a	22,1 ^b	*	22,6	23,0	NS	21,0	24,1	NS	NS	*	*	1,279
	DPB	38,8 ^a	25,6 ^b	**	48,1	29,5	NS	27,6	26,8	NS	**	*	NS	1,456
c, h ⁻¹	DMS	0,019	0,033	NS	0,175	0,122	NS	0,080	0,049	NS	NS	***	NS	0,007
	DPB	0,027 ^a	0,060 ^b	**	0,065 ^a	0,079 ^b	*	0,088	0,059	*	NS	*	***	0,003
DP, %	DMS	74,5 ^a	56,6 ^b	*	71,8	72,2	NS	61,7	65,2	NS	NS	*	*	1,307
	DPB	90,4 ^a	78,1 ^b	**	92,7	73,5	NS	77,7	79,0	NS	**	NS	*	1,318
DE, %	DMS	46,1	45,0	NS	67,0	66,3	NS	54,4	53,1	NS	*	***	NS	0,186
	DPB	66,8	67,5	NS	66,2	63,0	NS	68,6	66,5	NS	NS	NS	NS	0,610

HACO: heno de alfalfa + concentrado; a: fracción rápidamente degradable; b: fracción potencialmente degradable; c: velocidad de degradación de la fracción b; DP = a+b: degradabilidad potencial; DE, % = $a+(b*c)/(c+k)$: degradabilidad efectiva, k = 0,042 para ovino y caprino (calculado a partir del flujo de la saliva artificial en los fermentadores); SE: significación estadística; NS: no significativo (P > 0,05); *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001; E: efecto de la especie animal donadora del inoculo ruminal; A: efecto del tipo de alimento incubado; ExA: interacción entre la especie animal donadora del inoculo ruminal y el tipo de alimento incubado; las letras en superíndice, en una misma fila y para cada uno de los alimentos incubados, representan diferencias significativas para cada valor debidas, al efecto de la especie animal donadora del inoculo ruminal; EEM: error estándar de la media.

Los parámetros de la degradabilidad de la materia seca y de la proteína bruta de la hoja de olivo, incubada en los fermentadores inoculados con líquido ruminal de ovino o caprino y alimentados con hoja de olivo, aparecen en la Tabla 12.

Ningún parámetro de la degradabilidad ruminal se ve afectado por la procedencia del inoculo (P > 0,05). Sin embargo, se observa una tendencia para a, b y DP de la MS y b, c y DE de la PB, a mostrar valores superiores en fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino.

Tabla 12. Características de la degradación de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) de la hoja de olivo obtenidas en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino y alimentados con hoja de olivo. Efecto de la especie animal donadora del inoculo ruminal.

	<i>a</i> , %	<i>b</i> , %	<i>c</i> , h ⁻¹	DP, %	DE, %
DMS					
Ovino	31,7	2,60	0,047	34,3	33,0
Caprino	31,8	3,83	0,026	35,6	32,9
SE	NS	NS	NS	NS	NS
DPB					
Ovino	30,7	3,88	0,034	34,6	32,0
Caprino	30,2	4,15	0,063	34,4	32,2
SE	NS	NS	NS	NS	NS

a: fracción rápidamente degradable; *b*: fracción potencialmente degradable; *c*: velocidad de degradación de la fracción *b*; DP = *a*+*b*: degradabilidad potencial; DE, % = $a+(b*c)/(c+k)$: degradabilidad efectiva, *k* = 0,042 para ovino y caprino (calculado a partir del flujo de la saliva artificial en los fermentadores); SE: significación estadística; NS: no significativo ($P > 0,05$).

Los valores de la degradabilidad de la materia seca y de la proteína bruta de las habas y de la cebada, determinada en fermentadores alimentados con la dieta HOSUP aparecen en la Tabla 13.

Los valores no muestran diferencias significativas con excepción de los de la DE de la PB para cebada, mayor ($P < 0,05$) en los fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino así como de (*b*) y DE de la PB de habas significativamente ($P < 0,001$ y $P < 0,01$, respectivamente) superiores en fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino. La interacción “especie animal x tipo de alimento” es significativa solamente para los parámetros (*b*) y DP de la PB.

Tabla 13. Características de la degradación de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) de la cebada y de las habas obtenidas en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino y alimentados con la dieta HOSUP. Efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal y del tipo de alimento incubado.

Alimento incubado		Cebada			Habas						EEM
Especie animal		Ovino	Caprino	SE	Ovino	Caprino	SE	E	A	ExA	
<i>a</i> , %	DMS	37,5	36,7	NS	41,8	41,1	NS	NS	***	NS	0,398
	DPB	41,1	41,7	NS	46,9	44,5	NS	NS	***	NS	0,352
<i>b</i> , %	DMS	43,0	42,9	NS	52,2	56,3	NS	NS	***	NS	1,099
	DPB	39,1	35,7	NS	46,8 ^a	54,2 ^b	***	*	***	***	0,414
<i>c</i> , h ⁻¹	DMS	0,130	0,155	NS	0,017	0,027	NS	*	***	NS	0,004
	DPB	0,040	0,060	NS	0,021	0,038	NS	NS	NS	NS	0,005
DP, %	DMS	80,6	79,6	NS	93,9	97,4	NS	NS	***	NS	0,827
	DPB	80,3	77,3	NS	77,5	98,8	NS	NS	***	**	0,454
DE, %	DMS	70,0	70,4	NS	56,9	62,7	NS	NS	**	NS	1,128
	DPB	60,2 ^a	62,3 ^b	*	62,3 ^a	62,6 ^b	**	NS	NS	NS	1,599

a: fracción rápidamente degradable; *b*: fracción potencialmente degradable; *c*: velocidad de degradación de la fracción *b*; DP = *a*+*b*: degradabilidad potencial; DE, % = $a + (b \cdot c) / (c + k)$: degradabilidad efectiva, *k* = 0,042 para ovino y caprino (calculado a partir del flujo de la saliva artificial de los fermentadores); SE: significación estadística; NS: no significativo (*P* > 0,05); *: *P* < 0,05; **: *P* < 0,01; ***: *P* < 0,001; E: efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal; A: efecto del tipo de alimento incubado; ExA: interacción entre la especie animal donadora del inóculo ruminal y el tipo de alimento incubado; las letras en superíndice, en una misma fila, representan diferencias significativas para cada valor debidas al efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal; EEM: error estándar de la media.

4.3.2. Efecto de la adición de PEG sobre la degradabilidad de la materia seca y de la proteína bruta del concentrado (CO) y de la dieta HACO.

Los valores correspondientes al efecto de la adición de PEG sobre la degradabilidad de la materia seca y de la proteína bruta del concentrado aparecen en la Tabla 14. La adición de PEG afecta significativamente a la velocidad de degradación (*c*) de la PB en aquellos fermentadores que se inoculaban con líquido ruminal de caprino. Los parámetros (*b*) y (*c*) de la MS y de la PB aumentan mientras que los valores de *a* disminuyen con la adición de PEG a los fermentadores.

Tabla 14. Características de la degradación de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) del concentrado (CO) en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. Efecto de la especie animal donadora del inoculo ruminal y de la adición de PEG.

Alimento incubado		CO HACO			CO HACOP			E	P	ExP	EEM
Dieta		Ovino	Caprino	SE	Ovino	Caprino	SE				
<i>a</i> , %	DMS	62,2	62,7	NS	49,2	49,2	NS	NS	***	NS	0,199
	DPB	65,0	65,4	NS	44,7	44,1	NS	NS	***	NS	0,338
<i>b</i> , %	DMS	14,4	18,6	NS	22,6	23,0	NS	NS	*	NS	1,061
	DPB	19,9	21,7	NS	48,1	29,5	NS	NS	**	NS	2,437
<i>c</i> , h ⁻¹	DMS	0,067	0,115	NS	0,175	0,122	NS	NS	NS	NS	0,016
	DPB	0,054	0,045	NS	0,065 ^a	0,079 ^b	*	NS	NS	*	0,006
DP, %	DMS	76,6	81,3	NS	71,8	72,2	NS	NS	*	NS	1,141
	DPB	85,0	87,1	NS	92,7	73,5	NS	NS	NS	*	2,260
DE, %	DMS	62,1	74,9	NS	67,0	66,3	NS	NS	NS	*	1,532
	DPB	76,6	78,5	NS	66,2	63,0	NS	NS	***	NS	0,925

a: fracción rápidamente degradable; *b*: fracción potencialmente degradable; *c*: velocidad de degradación de la fracción *b*; DP = *a*+*b*: degradabilidad potencial; DE, % = $a+(b*c)/(c+k)$: degradabilidad efectiva, $k = 0,042$ para ovino y caprino (calculado a partir del flujo de la saliva artificial en los fermentadores); SE: significación estadística; NS: no significativo ($P > 0,05$); *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; E: efecto de la especie animal donadora del inoculo ruminal; P: efecto de la adición de PEG; ExP: interacción entre la especie animal donadora del inoculo ruminal y la adición de PEG; las letras en superíndice, en una misma fila, representan diferencias significativas para cada valor, debidas al efecto de la especie animal donadora del inoculo ruminal; EEM: error estándar de la media.

Los valores de la degradabilidad ruminal de la dieta HACO, incubada en los fermentadores de flujo continuo alimentados con esa misma dieta y con adición de PEG se muestran en la Tabla 15. En general, los parámetros (*b*) y (*c*) presentan valores superiores cuando se adiciona PEG a los fermentadores, independientemente de la especie animal de la que proceda el inoculo. Sin embargo, las fracciones (*a*) y DE tienden a disminuir con la adición de PEG. La interacción "especie animal x adición de PEG" es significativa para los parámetros *c* de PB y DE de la MS.

Tabla 15. Características de la degradación de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) de la dieta HACO en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. Efecto de la especie animal donadora del inoculo ruminal y de la adición de PEG.

Alimento incubado Dieta	HACO			HACO HACOP			E	P	ExP	EEM	
	Ovino	Caprino	SE	Ovino	Caprino	SE					
Especie animal <i>a</i> , %	DMS	53,7	54,2	NS	40,7	41,2	NS	NS	**	NS	0,257
	DPB	64,3 ^a	65,2 ^b	*	50,0	52,1	NS	*	***	NS	0,314
<i>b</i> , %	DMS	12,4	12,8	NS	21,0	24,1	NS	NS	**	NS	1,271
	DPB	16,2	13,8	NS	27,6	26,8	NS	NS	***	NS	0,530
<i>c</i> , h ⁻¹	DMS	0,032	0,042	NS	0,080	0,049	NS	NS	*	NS	0,005
	DPB	0,052	0,050	NS	0,088	0,059	*	*	NS	*	0,004
DP, %	DMS	66,1	67,1	NS	61,7	65,2	NS	NS	NS	NS	1,209
	DPB	80,5	79,0	NS	77,7	79,0	NS	NS	NS	NS	0,349
DE, %	DMS	60,2 ^a	61,3 ^b	***	54,4	53,1	NS	NS	***	**	0,177
	DPB	74,7 ^a	73,7 ^b	***	68,6	66,5	NS	**	***	NS	0,238

HACO: heno de alfalfa + concentrado; *a*: fracción rápidamente degradable; *b*: fracción potencialmente degradable; *c*: velocidad de degradación de la fracción *b*; DP = *a*+*b*: degradabilidad potencial; DE, % = $a + (b \cdot c)/(c+k)$: degradabilidad efectiva, $k = 0,042$ para ovino y caprino (calculado a partir del flujo de la saliva artificial de los fermentadores); SE: significación estadística; NS: no significativo ($P > 0,05$); *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; E: efecto de la especie animal donadora del inoculo ruminal; P: efecto de la adición de PEG; ExP: interacción entre la especie animal donadora del inoculo ruminal y la adición de PEG; las letras en superíndice, en una misma fila, representan diferencias significativas para cada valor, debidas al efecto de la especie animal donadora del inoculo ruminal; EEM: error estándar de la media.

4.4. ENSAYOS CON FERMENTADORES DE FLUJO CONTINUO.

4.4.1. Dietas experimentales.

La composición en ingredientes de las dietas experimentales ensayadas en los fermentadores de flujo continuo aparece en la Tabla 2 del capítulo material y métodos.

Las dietas están constituidas por heno de alfalfa, heno de alfalfa y concentrado en la proporción 60:40, heno de alfalfa y concentrado en la misma proporción y con la adición de PEG (2 g/1 g de taninos condensados totales), hoja de olivo procedente de la limpieza de la aceituna en almazara y hoja de olivo suplementada con habas y cebada grano.

4.4.2. Características de los inóculos ruminales.

Los valores de pH y de las concentraciones de nitrógeno amoniacal y de ácidos grasos volátiles del líquido ruminal utilizado como inóculo en los fermentadores aparecen en la Tabla 16. Los valores de pH están dentro de los valores fisiológicos normales del pH ruminal que oscilan entre 5,2 y 6,9. Los valores más bajos corresponden a los animales alimentados con la dieta HACOP (5,66 y 5,66 para ovino y caprino, respectivamente) y los

más elevados a los animales alimentados con la dieta HO (6,69 y 6,47 para ovino y caprino, respectivamente). Las concentraciones de AGV totales y sus proporciones individuales indican, que en los animales donadores de los inóculos tiene lugar una fermentación predominantemente acética. Los animales que recibían las dietas HA, HACO y HACOP presentan concentraciones de AGV totales y de amonio superiores en ovino que en caprino. Sin embargo, cuando los animales consumían las dietas HO y HOSUP, los valores eran más elevados en caprino que en ovino.

Tabla 16. Valores medios del pH y de las concentraciones de N-NH₃ (mg/100 ml) y ácidos grasos volátiles (mmol/l) del líquido ruminal de ovino o de caprino utilizado como inoculo en los fermentadores.

Dieta	Especie animal	pH	N-NH ₃	Acético	Propiónico	Isobutírico	Butírico	Isovalérico	Valérico	Caproíco	Totales	C2/C3
HA	Ovino	5,99	67,9	57,3	16,4	0,89	7,41	0,42	1,91	0,22	84,6	3,49
	Caprino	6,09	59,2	43,1	15,0	0,75	4,82	0,40	1,84	0,19	66,2	2,87
HACO	Ovino	5,95	44,6	137	23,2	0,62	23,5	0,24	1,27	0,28	186	5,89
	Caprino	5,95	33,8	57,2	18,2	0,77	8,48	0,38	1,91	0,27	87,2	3,15
HACOP	Ovino	5,66	26,3	93,1	22,0	0,97	14,4	0,51	2,44	0,32	134	4,24
	Caprino	5,66	15,2	62,0	19,0	0,66	12,3	0,33	1,72	0,26	96,3	3,27
HO	Ovino	6,69	0,29	18,7	3,6	0,34	2,76	0,65	0,97	0,99	27,9	5,24
	Caprino	6,47	0,50	24,7	7,9	0,10	2,72	0,87	1,17	0,98	38,5	3,13
HOSUP	Ovino	6,03	2,20	33,8	7,9	0,53	7,39	1,04	1,16	1,11	53,0	4,27
	Caprino	5,99	10,1	56,0	11,9	0,82	15,06	1,53	1,74	1,40	88,5	4,71

HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + cebada + habas.

Tabla 17. Cantidades de nutrientes y taninos condensados totales suministradas (g/día) a los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales.

Dieta	Nt,				EB,				NFAD,		TCL,	TCF,	TCP,	TCT,			
	MF	MS	MO	EE	mg/día	CHO	kJ/día	FND	FAD	HC	LAD	mg/día	mg/día	mg/día	mg/día		
HA	50,7	46,3	40,6	0,81	1341	31,4	816	17,9	11,3	6,64	2,20	9,08	103	49,8	46,2	129	225
HACO	59,0	53,7	48,1	1,01	1183	39,7	955	22,4	11,6	10,8	2,67	8,88	107	95,8	68,3	154	319
HACOP	69,0	62,8	56,4	1,07	1434	46,4	1148	24,2	13,5	10,7	3,77	9,68	161	132	74,9	160	368
HO	42,8	40,2	35,6	3,21	503	29,2	842	15,9	10,2	5,75	5,63	4,56	226	141	253	50	443
HOSUP	41,0	38,0	34,6	2,25	624	28,4	763	13,4	7,41	6,03	3,77	3,64	156	245	165	64	473

HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + cebada + habas.

4.4.3. Nutrientes suministrados.

Las cantidades de nutrientes y de las diferentes fracciones de taninos condensados suministradas a los fermentadores aparecen en la Tabla 17.

La cantidad de MS suministrada osciló entre 38,0 y 62,8 g/día, dependiendo del tipo de dieta, siendo el valor medio de 48,2 g/día. Estos valores representan las ingestas que, con las correspondientes dietas experimentales, se observaron en los animales alimentados a nivel de mantenimiento con esas mismas dietas.

El suministro de MO osciló entre 34,6 y 56,4 g/día para la dieta HOSUP y HACOP, respectivamente, el valor medio fue de 43,1 g/día. Los valores de CHO oscilaron entre 28,4 y 46,4 g/día, siendo siempre los valores más elevados para la dieta HACOP. La cantidad de energía suministrada oscilaba entre 0,76 y 1,14 MJ de EB/día para las dietas HOSUP y HACOP, respectivamente. El valor medio fue de 0,91 MJ de EB/día.

El suministro medio de componentes de las paredes celulares (FND) oscilaba entre 13,4 y 24,2 g/día, siendo el valor medio de 18,7 g/día. El suministro de FAD oscilaba entre 7,41 y 13,5 g/día. Los valores de lignina variaban entre 2,20 g/día de la dieta HA y 5,63 g/día de la dieta HO.

Los TCL suministrados a los fermentadores variaban desde 49,8 mg/día con la dieta HA a 245 mg/día con la dieta HOSUP. El suministro de los TCF oscilaba entre 46,2 y 253 mg/día para las dietas HA y HO, respectivamente. El suministro de TCP también fue elevado con la dieta HACOP, y bajo con la dieta HO. Las cantidades de TCT suministradas a los fermentadores fueron de 225 mg/día con la dieta constituida por heno de alfalfa y 473 mg/día con la dieta HOSUP.

El suministro de Nt a los fermentadores variaba entre 1,43 y 0,5 g/día, respectivamente para las dietas HACOP y HO.

Los valores de bases púricas suministradas a los fermentadores aparecen en la Tabla 18. Los valores más elevados corresponden a la dieta HA y los menores a la dieta HOSUP.

Tabla 18. Cantidades de bases púricas suministradas ($\mu\text{mol}/\text{día}$) a los fermentadores alimentados con distintas dietas experimentales

Dieta	Adenina	Guanina	Total BP
HA	365	849	1214
HACO	268	714	982
HACOP	297	813	1110
HO	170	404	574
HOSUP	151	349	500

HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG, HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada; BP: bases púricas.

El suministro de nitrógeno aminoacídico total a los fermentadores aparece en la Tabla 19. La cantidad de N-aa total suministrado a los fermentadores oscilaba entre 1587 y 334 mg N-aa/día, valores que corresponden a las dietas HA y HO, respectivamente. El mayor suministro de metionina correspondía a las dietas HA y HACOP (8,11 y 8,73 mg N-aa/día, respectivamente) y el menor a la dieta HO (1,89 mg N-aa/día). El suministro de lisina también fue muy elevado con la dieta HA (141 mg N-aa/día) y muy bajo con la hoja de olivo (16,6 mg N-aa/día). El suministro de AAE a los fermentadores fue muy superior en los tres primeros ensayos, con dietas a base de heno de alfalfa; sin embargo, la cantidad de AAE suministrada en los ensayos con hoja de olivo fue baja, correspondiendo los valores más bajos a la dieta HO (180 mg N-aa/día). Los valores individuales de aminoácidos suministrados oscilaban entre 242 mg N-aa/día de aspártico con la dieta HA y 1,89 mg N-aa/día de metionina con la dieta HO.

Tabla 19. Cantidades de aminoácidos suministrados (mg N-aa/día) a los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales.

Dieta	Asp	Glu	Ser	Gli	His	Arg	Tre	Ala	Pro	Tir	Val	Met	Cis	Ile	Leu	Fen	Lis	AAE	AAEAATOT	
HA	242	115	88,4	104	72,8	180	58,3	90,5	193	29,7	67,7	8,11	16,0	46,6	91,3	43,3	141	709	878	1587
HACO	107	100	61,6	80,8	34,4	138	40,8	69,1	135	22,3	51,9	6,07	9,85	33,7	67,3	32,7	76,4	481	585	1066
HACOP	126	127	74,2	92,0	45,2	162	45,2	78,3	148	26,8	58,2	8,73	13,5	38,6	76,1	35,9	85,7	556	686	1242
HO	24,1	25,9	19,1	27,0	17,3	54,8	16,9	28,3	18,5	9,0	18,6	1,89	2,34	19,3	20,9	13,3	16,6	180	154	334
HOSUP	33,3	50,8	23,8	32,6	21,4	82,0	18,5	32,4	29,6	10,5	21,9	2,84	3,57	19,8	24,3	15,2	26,7	233	216	449

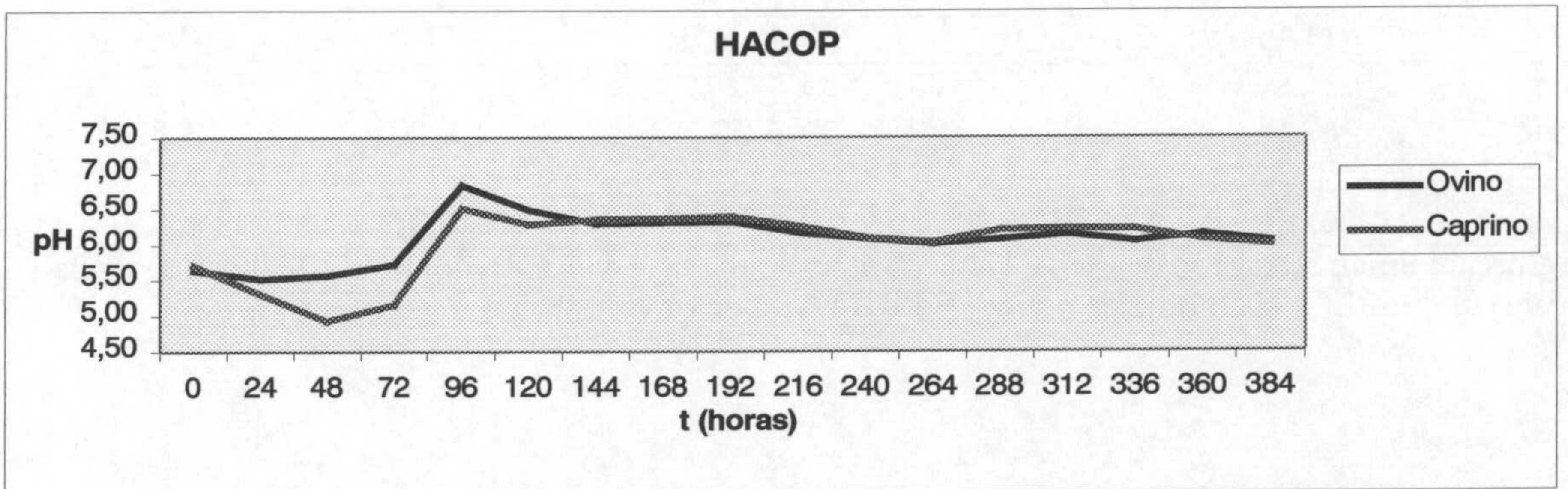
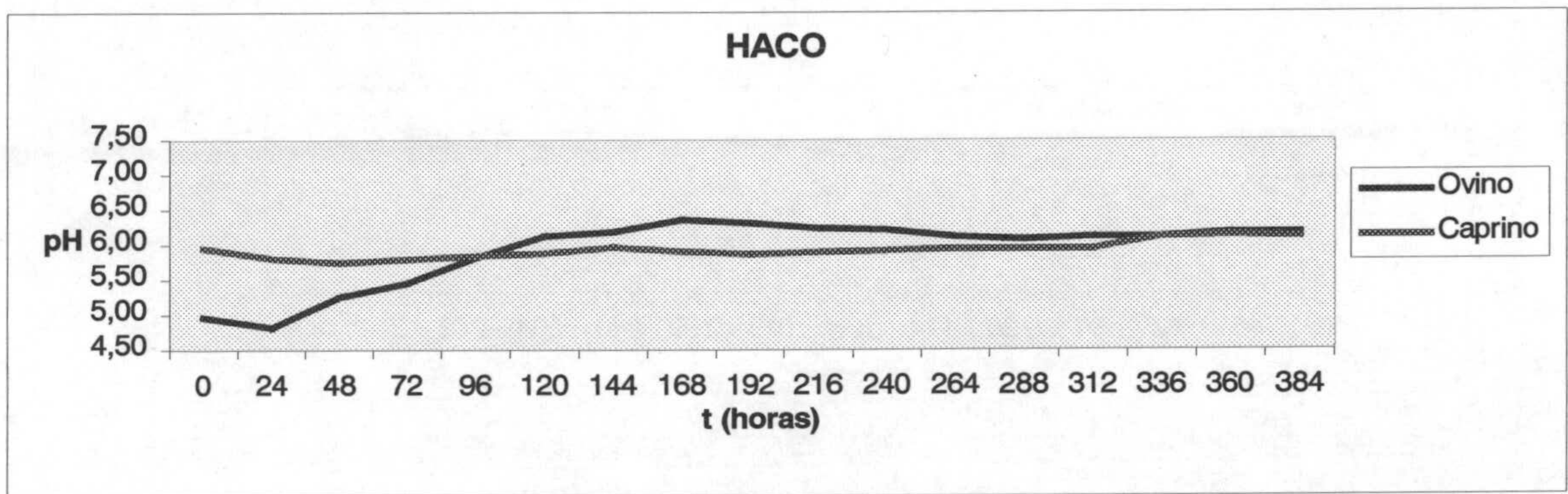
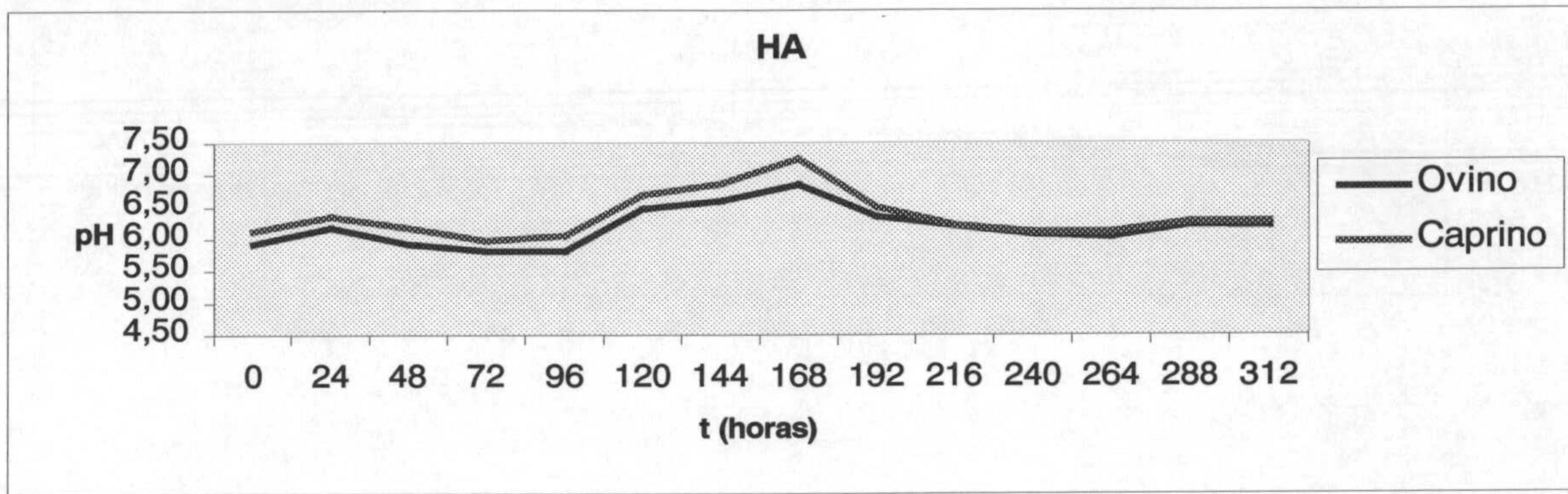
HA: heno de alfalfa, HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada; AAE: amino ácidos esenciales; AAENE: aminoácidos no esenciales; AATOT: aminoácidos totales.

4.4.4. Valores de pH de los contenidos de los fermentadores.

En la figura 5 y en las Tablas 20 y 20 bis aparecen la evolución del pH y los valores medios correspondientes a los contenidos de fermentadores alimentados con las distintas dietas a lo largo de cada ensayo. En los fermentadores alimentados con la dieta HA, los valores medios eran de 6,19 y 6,35 cuando el inóculo procedía de ovino o de caprino, respectivamente. Cuando parte del heno de alfalfa se sustituyó por el concentrado, los valores medios de pH disminuyen (6,01 y 6,00 para la dieta HACO y 6,08 y 6,01 para la dieta HACOP, en los fermentadores inoculados con líquido ruminal de ovino y caprino, respectivamente). Cuando los fermentadores recibían las dietas HO y HOSUP, los valores de pH se mantenían constantes durante el ensayo. Los valores de pH en los fermentadores a los que se suministraba la dieta HO eran de 6,87 y 6,81 cuando los inóculos procedían de ovino y caprino, respectivamente. Cuando se suplementaba la dieta HO con habas y cebada (dieta HOSUP), se observó un ligero descenso en los valores medios de pH (6,52 y 6,51 para los fermentadores inoculados con líquido ruminal de ovino y caprino, respectivamente).

No se observó un efecto significativo, derivado del origen del inóculo ruminal. Tampoco la adición de PEG tuvo efecto sobre el pH medio de los fermentadores. Sin embargo, el efecto de la dieta si resultó significativo ($P < 0,001$).

Figura 5. Evolución del pH del contenido de los fermentadores durante los ensayos.



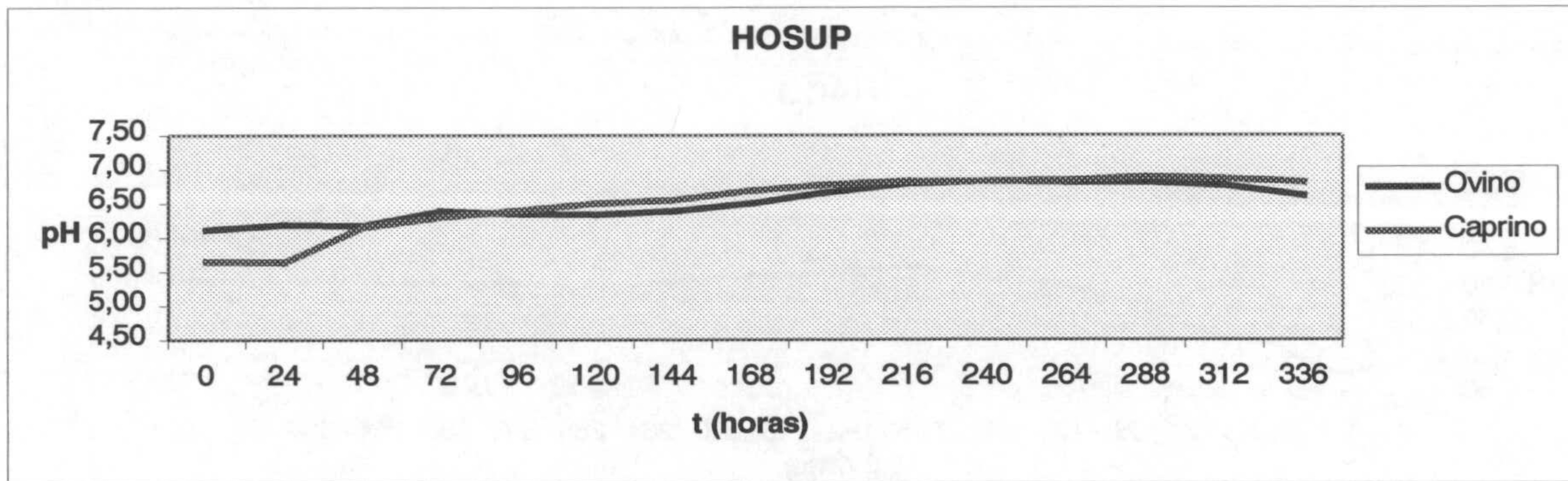
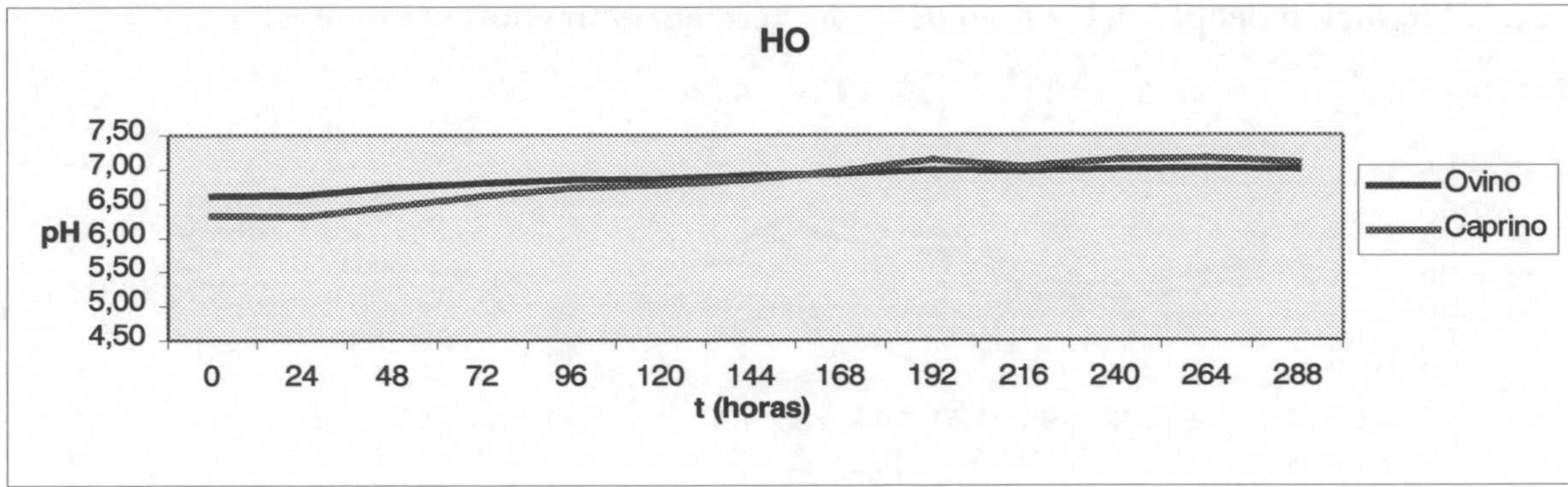


Tabla 20. Valores medios del pH del contenido de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

	pH				
	HA	HACO	HACOP	HO	HOSUP
EA					
Ovino	6,19	6,01	6,08	6,87	6,52
Caprino	6,35	6,01	6,00	6,81	6,51

EA: especie animal; HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG, HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada.

Tabla 20 bis. Efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal, del tipo de dieta suministrada y de la adición de PEG sobre el pH medio de los contenidos de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

	Especie animal			Dietas						HACO			Interacción		EEM
	Ovino	Caprino	SE	HA	HACO	HACOP	HO	HOSUP	SD	Sin PEG	Con PEG	SP	ExD	ExP	
pH	6,31	6,32	NS	6,27 ^{bc}	6,01 ^a	6,04 ^{ab}	6,84 ^d	6,51 ^c	***	6,01	6,04	NS	NS	NS	0,037

HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG, HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada; las letras en superíndice, en una misma fila, representan diferencias significativas para cada valor debidas al efecto del tipo de dieta suministrada; SE: significación del efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal; SD: significación del efecto del tipo de dieta; SP: significación de la adición de PEG; ExD: interacción entre la especie animal donadora del inóculo ruminal y el tipo de dieta suministrada; ExP: interacción entre la especie animal donadora del inóculo ruminal y de la adición de PEG; NS: no significativo ($P > 0,05$); ***: $P < 0,001$. EEM: error estándar de la media.

4.4.5. Concentración de protozoos en los efluentes y en los contenidos de fermentadores.

La concentración total de protozoos en los efluentes de los fermentadores alimentados con heno de alfalfa e inoculados con líquido ruminal de ovino o caprino aparece en la Tabla 21.

La especie animal donadora del inóculo ruminal no afecta a la concentración de protozoos ($P > 0,05$). El momento de muestreo del efluente en relación al inicio del ensayo afecta a las concentraciones de entodiniomorfos y de protozoos totales ($P < 0,001$). Los protozoos desaparecen totalmente de los efluentes a los 7 días del inicio de los ensayos.

La concentración total de protozoos ruminales en los contenidos de los fermentadores alimentados con heno de alfalfa e inoculados con líquido ruminal de ovino o caprino, durante el periodo del ensayo aparece en la Tabla 22.

El efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal no es significativo ($P > 0,05$). El momento de muestreo en relación al del inicio del ensayo correspondiente afecta significativamente a la concentración de entodiniomorfos y de protozoos totales ($P < 0,001$) así como a la de holotricos ($P < 0,01$). Los protozoos desaparecen del contenido del fermentador a los 7 días. Los holotricos desaparecen a los 3 días del inicio del ensayo.

Tabla 21. Concentración de protozoos ($\times 10^5/\text{ml}$) en los efluentes de fermentadores alimentados con heno de alfalfa e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. Efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal y del tiempo de muestreo.

EA		Días de muestreo							SE			EEM
		1	2	3	4	5	6	7	E	T	EXT	
Ovino	Entod.	4,20	1,55	1,45	0,75	0,20	0,20	0,00	NS	***	NS	0,143
	Holo.	0,00	0,00	0,10	0,00	0,05	0,00	0,00	NS	NS	NS	0,006
	Total	4,20	1,55	1,55	0,75	0,25	0,20	0,00	NS	***	NS	0,143
Caprino	Entod.	2,65	1,55	1,40	0,95	0,35	0,15	0,00				
	Holo.	0,05	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00				
	Total	2,70	1,55	1,40	1,00	0,35	0,15	0,00				

EA: especie animal; Entod.: entodiniomorfos; Holo.: holotricos; Total: (Entod. + Holo); SE: significación estadística; E: efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal; T: efecto del tiempo de muestreo; ExT: interacción entre la especie animal donadora del inóculo ruminal y el tiempo de muestreo; NS: no significativo ($P > 0,05$); ***: $P < 0,001$; EEM: error estándar de la media.

Tabla 22. Concentración de protozoos ($\times 10^5/\text{ml}$) en los contenidos de fermentadores alimentados con heno de alfalfa e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. Efecto de la especie animal donadora del inoculo ruminal y del tiempo de muestreo.

		Días de muestreo							SE			EEM
		0	2	3	4	5	6	7	E	T	E x T	
Ovino	Entod.	2,80	1,65	1,45	0,70	0,55	0,20	0,00	NS	***	NS	0,050
	Holo.	0,15	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	NS	**	NS	0,012
	Total	2,95	1,65	1,55	0,70	0,55	0,20	0,00	NS	***	NS	0,052
Caprino	Entod.	3,05	1,85	1,60	1,15	0,60	0,20	0,00				
	Holo.	0,25	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00				
	Total	3,30	1,95	1,60	1,15	0,60	0,20	0,00				

Entod.: entodiniomorfos; Holo.: holotricos; Total: (entod. + holo.); Día 0 corresponde al líquido ruminal del animal; SE: significación estadística; E: efecto de la especie animal donadora del inoculo ruminal; T: efecto del tiempo de muestreo; ExT: interacción entre la especie animal donadora del inóculo ruminal y el tiempo de muestreo; NS: no significativo ($P > 0,05$); **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

4.4.6. Pesos y volúmenes de los efluentes.

Los pesos y volúmenes de los efluentes correspondientes a los ensayos realizados con fermentadores de flujo continuo aparecen en la Tabla 23.

La especie animal donadora del inóculo ruminal no afecta ($P > 0,05$) ni a los pesos ni a los volúmenes de los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas. Tampoco la interacción "especie animal x dieta" resultó significativa ($P > 0,05$). Sin embargo, el tipo de la dieta afecta significativamente a los pesos y volúmenes de los efluentes de los fermentadores ($P < 0,001$) (Tabla 23 bis). La adición de PEG no afectó ni a los pesos ni a los volúmenes de los efluentes de los fermentadores, ni tampoco provocó una interacción significativa "especie animal x adición de PEG".

Tabla 23. Pesos (g/día) y volúmenes (ml/día) de los efluentes correspondientes a los ensayos con fermentadores de flujo continuo alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

Dieta	EA	g/día		ml/día		DT	DT
HA	Ovino	1012	± 40,4	974	± 46,4		
	Caprino	1059	± 43,2	1037	± 40,9		
HACO	Ovino	905	± 41,4	881	± 38,6		
	Caprino	845	± 6,2	820	± 6,0		
HACOP	Ovino	981	± 7,3	963	± 6,3		
	Caprino	977	± 6,5	959	± 6,9		
HO	Ovino	1017	± 18,9	1011	± 18,2		
	Caprino	978	± 9,9	974	± 9,6		
HOSUP	Ovino	945	± 32,9	937	± 31,8		
	Caprino	1009	± 7,8	1003	± 7,5		

EA: especie animal; DT: desviación típica; HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada.

Tabla 23 bis. Efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal, del tipo de dieta suministrada y de la adición de PEG sobre los pesos y volúmenes de los efluentes de fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

	Especie Animal			Dieta						HACO			Interacción		EEM
	Ovino	Caprino	SE	HA	HACO	HACOP	HO	HOSUP	SD	Sin PEG	Con PEG	SP	ExD	ExP	
g/día	1101	1106	NS	1217 ^b	1170 ^b	1140 ^b	1092 ^b	901 ^a	***	1169	1140	NS	NS	NS	17,3
ml/día	1093	1101	NS	1202 ^b	1149 ^b	1115 ^b	1148 ^b	872 ^a	***	1149	1115	NS	NS	NS	18,1

HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada; las letras en superíndice, en una misma fila, representan diferencias significativas para cada valor debidas al efecto de la especie animal, del tipo de dieta suministrada o de la adición de PEG; SE: significación del efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal; SD: significación del efecto del tipo de dieta; SP: significación de la adición de PEG; ExD: interacción entre la especie animal donadora del inóculo ruminal y del tipo de dieta; ExP: interacción entre la especie animal donadora del inóculo ruminal y la adición de PEG; NS: no significativo ($P > 0,05$); ***: $P < 0,001$; EEM: error estándar de la media.

4.4.7. Composición de los efluentes.

La composición de los efluentes producidos en los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino aparece en las Tablas 24 a 27.

Tabla 24. Contenido en bases púricas ($\mu\text{mol/g MS}$) de los efluentes obtenidos en los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

Dieta	EA	Adenina	Guanina	BP Totales
HA	Ovino	8,38	13,8	22,2
	Caprino	8,08	11,0	19,0
HACO	Ovino	4,39	8,39	12,8
	Caprino	4,81	18,2	23,0
HACOP	Ovino	5,21	17,6	22,8
	Caprino	6,09	13,5	19,6
HO	Ovino	1,85	1,37	3,22
	Caprino	2,05	1,64	3,69
HOSUP	Ovino	4,49	5,65	10,1
	Caprino	4,64	6,25	10,9

EA: especie animal; BP: bases púricas; HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada.

Tabla 25. Composición (g/100g MS) de los efluentes obtenidos en los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

Dieta	EA	MS, g/100gMF	MO	EE	PB	EB, KJ/g MS	FND	FAD	HC	LAD	NFAD, g/100g Nt	TCL, mg/g MS	TCF, mg/g MS	TCP, mg/g MS	TCT, mg/g MS	N-NH ₃ , mg/100ml
HA	Ovino	86,6	65,8	1,71	16,7	17,8	40,6	18,8	21,8	5,36	5,30	3,75	1,26	7,51	12,5	5,47
	Caprino	85,8	66,3	1,74	16,0	16,1	34,4	17,1	17,2	4,05	5,52	3,59	1,17	7,54	12,3	6,65
HACO	Ovino	88,0	74,1	1,87	14,9	17,2	44,1	24,2	19,9	6,35	8,40	4,71	1,37	7,76	13,8	0,72
	Caprino	89,9	70,9	1,86	16,3	17,9	40,7	25,1	15,5	6,61	8,19	5,02	1,29	7,43	13,7	0,78
HACOP	Ovino	92,4	69,2	0,86	15,9	16,8	35,0	19,4	15,5	6,02	9,07	0,32	1,45	2,54	4,30	0,78
	Caprino	93,6	68,4	0,85	15,7	16,5	34,0	18,5	15,4	5,39	8,92	0,28	1,50	2,63	4,41	0,24
HO	Ovino	93,1	60,7	3,64	4,96	13,3	18,8	12,8	6,08	7,22	68,9	0,91	0,27	3,50	4,68	0,17
	Caprino	92,7	57,6	3,21	4,80	13,0	18,4	12,4	6,05	7,17	73,7	0,47	0,27	3,64	4,38	0,17
HOSUP	Ovino	94,5	65,8	1,94	9,55	16,8	26,1	14,7	11,5	8,56	39,0	0,76	0,35	3,28	4,39	0,26
	Caprino	91,5	60,0	1,61	9,02	15,6	20,4	11,0	9,35	6,82	34,2	0,57	0,29	2,90	3,75	0,20

EA: especie animal; HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas cebada.

Tabla 26. Composición en aminoácidos (mg Naa/100 g Nt) de los efluentes obtenidos en los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

Dieta	EA	Asp	Glu	Ser	Gli	His	Arg	Tre	Ala	Pro	Tir	DAPA	Val	Met	Cis	Ile	Leu	Fen	Lis	AAE	AANE	AATOT
HA	Ovino	3,48	4,59	2,76	4,39	1,75	6,88	2,98	3,96	2,23	1,57	0,31	3,50	0,70	0,90	2,84	4,18	2,16	4,88	29,9	23,9	54,0
	Caprino	4,34	4,74	2,47	3,03	1,63	6,36	3,06	3,89	1,50	1,94	0,44	4,09	0,61	0,76	3,58	3,84	2,12	4,60	29,9	22,7	53,0
HACO	Ovino	5,19	5,95	2,89	4,01	1,97	7,88	3,22	4,06	2,42	1,78	0,42	3,99	0,67	0,78	3,06	4,22	2,18	3,95	31,1	27,1	58,6
	Caprino	4,54	5,84	2,66	3,10	1,80	7,19	3,00	3,82	1,87	3,55	0,44	4,07	0,63	0,84	3,26	3,80	2,00	3,96	29,7	26,2	56,4
HACOP	Ovino	4,65	6,09	2,55	3,14	1,62	6,84	2,92	3,76	1,99	1,54	0,49	4,13	0,79	0,93	3,55	4,07	2,21	4,92	31,1	24,6	56,2
	Caprino	4,70	6,27	3,00	4,15	1,86	7,72	3,37	3,98	2,66	1,63	0,40	3,77	0,86	0,83	2,99	4,24	2,20	5,04	32,1	27,2	59,7
HO	Ovino	5,11	5,01	3,43	5,15	2,29	9,00	3,52	5,28	3,39	1,90	0,48	3,83	0,25	0,37	3,16	4,74	2,68	1,14	30,6	29,6	60,7
	Caprino	5,34	4,92	3,28	4,82	2,44	8,65	3,35	5,05	3,13	1,82	0,39	3,67	0,26	0,36	2,86	4,23	2,42	1,58	29,5	28,7	58,6
HOSUP	Ovino	4,91	6,50	3,12	4,57	2,43	9,02	2,93	4,79	3,34	1,82	0,53	3,36	0,32	0,38	2,63	3,58	2,16	2,21	28,6	29,4	58,6
	Caprino	4,97	6,75	3,47	5,01	2,89	9,58	3,40	5,35	3,69	2,21	0,65	3,52	0,32	0,37	2,83	3,87	2,35	3,37	32,1	31,8	64,6

EA: especie animal; HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada; AAE: aminoácidos esenciales; AANE: aminoácidos no esenciales; AATOT: aminoácidos totales.

Tabla 27. Composición en ácidos grasos volátiles (mmol/l) de los efluentes obtenidos en los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino

Dieta	EA	Acético	Propiónico	Isobutírico	Butírico	Isovalérico	Valérico	Caproíco	Totales	C2/C3
HA	Ovino	71,4	19,9	0,480	9,85	0,199	2,39	0,285	105	3,59
	Caprino	87,5	26,8	0,595	13,5	0,293	3,14	0,639	132	3,26
HACO	Ovino	53,7	27,9	0,918	15,4	0,437	8,44	0,876	108	1,92
	Caprino	69,5	30,5	0,688	19,1	0,276	7,77	1,062	129	2,27
HACOP	Ovino	76,2	25,9	0,524	21,7	0,234	5,92	3,382	134	2,94
	Caprino	95,7	30,2	0,893	16,0	0,381	13,3	4,231	161	3,16
HO	Ovino	10,7	1,50	0,126	0,713	0,458	1,04	0,882	15,4	7,15
	Caprino	11,1	1,36	0,116	1,449	0,421	1,07	0,904	16,4	8,22
HOSUP	Ovino	50,0	17,2	1,180	11,7	2,163	2,40	3,112	87,7	2,91
	Caprino	41,8	12,7	1,035	8,56	2,305	1,84	2,343	70,6	3,29

EA: especie animal; HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada.

4.4.8. Producción diaria en los efluentes.

Las producciones diarias obtenidas en los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino, aparecen en las Tablas 28 a 31.

4.4.8.1. Producción de nutrientes y de taninos condensados.

En la Tabla 28 aparece la producción diaria de nutrientes y de taninos condensados en los efluentes.

El origen del inóculo ruminal (Tabla 28 bis) modifica significativamente la producción diaria de EE ($P < 0,05$), FND, LAD y NFAD ($P < 0,01$) y de HC ($P < 0,001$). Todos estos parámetros presentan valores superiores cuando el inóculo ruminal utilizado en los fermentadores procede de ovino.

La dieta tiene un efecto significativo ($P < 0,001$) sobre la producción diaria de todos los nutrientes. La suplementación de hoja de olivo con habas y cebada (dieta HOSUP) aumenta la producción de todos los parámetros, a excepción del EE y TCP cuya producción es ligeramente superior cuando se suministra hoja de olivo sola a los fermentadores.

El efecto de la adición de PEG es significativo para las producciones diarias de MS y FND ($P < 0,05$), PB, FAD y TCF ($P < 0,01$) y EE, NFAD, TCL, TCP y TCT ($P < 0,001$). En general, la adición de PEG parece aumentar la producción diaria de nutrientes en los efluentes a excepción de EE, FND y FAD. Tampoco aumenta la producción de TCL, TCP y TCT.

La interacción “especie animal x dieta” resulta significativa para las producciones de FND ($P < 0,05$), EE, EB y LAD ($P < 0,01$) así como para las de PB, FAD y NFAD ($P < 0,001$).

La interacción “especie animal x adición de PEG” modifica significativamente la producción de EB y FND ($P < 0,05$); PB, FAD, LAD y NFAD ($P < 0,01$).

Tabla 28. Producción (g/día) de nutrientes y de taninos condensados en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

Dieta	EA	MS	MO	EE	PB*	CHO	EB, KJ/día	FND	FAD	HC	LAD	NFAD, mg/día	TCL, mg/día	TCP, mg/día	TCF, mg/día	TCT, mg/día
HA	Ovino	43,2	28,5	0,740	7,23	20,5	772	17,6	8,12	9,45	2,32	61,5	162	325	54,7	544
	Caprino	43,4	28,8	0,757	6,95	21,1	697	14,9	7,44	7,46	1,76	61,6	156	327	50,9	534
HACO	Ovino	44,7	32,9	0,821	6,62	25,5	763	19,3	10,6	8,73	2,78	88,3	210	345	59,4	614
	Caprino	50,0	35,5	0,932	8,17	26,4	892	20,3	12,6	7,77	3,30	107	252	371	64,1	687
HACOP	Ovino	55,0	38,1	0,478	8,73	28,9	924	19,2	10,7	8,55	3,31	126	17,4	140	79,6	237
	Caprino	52,2	35,7	0,442	8,20	27,1	861	17,7	9,67	8,07	2,81	117	14,7	137	78,4	230
HO	Ovino	30,4	18,5	1,107	1,51	15,9	406	5,73	3,88	1,85	2,20	166	27,8	107	8,25	143
	Caprino	25,6	14,8	0,827	1,23	12,7	334	4,72	3,17	1,55	1,84	145	11,3	93,1	6,97	112
HOSUP	Ovino	33,1	21,8	0,646	3,16	18,0	557	8,68	4,87	3,81	2,84	196	25,1	109	11,5	145
	Caprino	29,3	17,6	0,471	2,64	14,5	458	5,99	3,24	2,75	2,00	145	16,0	84,6	8,54	109

EA: especie animal; *: Producción de proteína bruta no corregida para las pérdidas de N-NH₃ durante la liofilización; HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada.

Tabla 28 bis. Efecto de la especie animal donadora del inoculo ruminal, del tipo de dieta suministrada y de la adición de PEG sobre la producción (g/día) de nutrientes y de taninos condensados en los efluentes obtenidos de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

	EA			Dietas						HACO			Interacciones		EEM
	Ovino	Caprino	SE	HA	HACO	HACOP	HO	HOSUP	SD	Sin PEG	Con PEG	SP	ExD	ExP	
MS	41,3	40,1	NS	43,3 ^b	47,3 ^b	53,6 ^c	28,0 ^a	31,2 ^a	***	47,3 ^a	53,6 ^b	*	NS	NS	0,952
MO	27,9	26,5	NS	28,6 ^b	34,2 ^c	36,9 ^c	16,6 ^a	19,7 ^a	***	34,2	36,9	NS	NS	NS	0,657
EE	0,758 ^b	0,684 ^a	*	0,748 ^b	0,878 ^{bc}	0,458 ^a	0,965 ^c	0,558 ^a	***	0,878 ^b	0,458 ^a	***	**	NS	0,020
PB	5,45	5,43	NS	7,09 ^c	7,39 ^c	8,47 ^d	1,37 ^a	2,9 ^b	***	7,39 ^a	8,47 ^b	**	***	**	0,125
CHO	21,7	20,3	NS	20,8 ^b	26,0 ^c	28,0 ^c	14,3 ^a	16,2 ^a	***	26,0	28,0	NS	NS	NS	0,528
EB, KJ/día	684	648	NS	735 ^c	828 ^d	892 ^d	369 ^a	508 ^b	***	828	892	NS	**	*	15,08
FND	14,1 ^b	12,7 ^a	**	16,2 ^c	19,8 ^d	18,5 ^d	5,22 ^a	7,33 ^b	***	19,8 ^b	18,5 ^a	*	*	*	0,229
FAD	7,6	7,2	NS	7,78 ^b	11,6 ^d	10,2 ^c	3,53 ^a	4,06 ^a	***	11,6 ^b	10,2 ^a	**	***	**	0,154
HC	6,48 ^b	5,51 ^a	***	8,47 ^c	8,24 ^c	8,31 ^c	1,70 ^a	3,28 ^b	***	8,24	8,31	NS	NS	NS	0,120
LAD	2,69 ^b	2,34 ^a	**	2,04 ^a	3,04 ^b	3,07 ^b	2,02 ^a	2,42 ^a	***	3,04	3,07	NS	**	**	0,062
NFAD, mg/día	128 ^b	115 ^a	**	61,5 ^a	97,5 ^b	122 ^c	156 ^d	171 ^d	***	97,5 ^a	122 ^b	***	***	**	1,798
TCL, mg/día	89,8	88,5	NS	159 ^b	231 ^c	16,0 ^a	19,6 ^a	20,6 ^a	***	231 ^b	16 ^a	***	NS	NS	5,485
TCP, mg/día	205	203	NS	326 ^b	358 ^b	138 ^a	99,9 ^a	96,5 ^a	***	357 ^b	138 ^a	***	NS	NS	6,687
TCF, mg/día	42,7	41,8	NS	52,8 ^b	61,7 ^b	79,0 ^c	7,61 ^a	10,0 ^a	***	61,8 ^a	79 ^b	**	NS	NS	1,869
TCT, mg/día	336	334	NS	538 ^c	650 ^d	234 ^b	127 ^a	127 ^a	***	650 ^b	234 ^a	***	NS	NS	11,35

EA: especie animal; HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada; las letras en superíndice, en una misma fila, representan diferencias significativas para cada valor debidas al efecto de la especie animal, del tipo de dieta o de la adición de PEG; SE: significación del efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal; SD: significación del efecto del tipo de dieta; SP: significación del efecto de la adición de PEG; ExD: interacción entre la especie animal donadora del inóculo ruminal y del tipo de dieta; ExP: interacción entre la especie animal donadora del inóculo ruminal y la adición de PEG; NS: no significativo ($P > 0,05$); *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; EEM: error estándar de la media.

4.4.8.2. Producción de bases púricas.

Los valores correspondientes a la producción diaria de bases púricas en los efluentes de fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales aparecen en la Tabla 29.

El origen del inóculo ruminal utilizado en los fermentadores no afecta significativamente ($P > 0,05$) a la producción diaria de bases púricas (Tabla 29 bis) pero, los valores son ligeramente superiores cuando los fermentadores se inoculan con líquido ruminal de caprino.

El efecto de la dieta suministrada al fermentador resulta significativo ($P < 0,001$) para la producción de todos los parámetros. El efecto de la adición de PEG resulta sólo significativo para la producción de adenina ($P < 0,01$).

La interacción “especie animal x dieta” es significativa para la producción diaria de guanina ($P < 0,01$) y BP totales ($P < 0,05$). La interacción “especie animal x adición de PEG” es significativa para todos los parámetros ($P < 0,05$), a excepción de la adenina ($P > 0,05$).

Tabla 29. Producción de bases púricas ($\mu\text{mol/ día}$) en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

Dieta	Especie animal	Adenina	Guanina	Totales BP
HA	Ovino	363	597	960
	Caprino	351	476	827
HACO	Ovino	197	369	570
	Caprino	241	914	1155
HACOP	Ovino	287	968	1254
	Caprino	317	700	1017
HO	Ovino	56,3	41,8	98,1
	Caprino	52,5	41,8	94,3
HOSUP	Ovino	148	188	336
	Caprino	136	183	319

BP: bases púricas; HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada.

Tabla 29 bis. Efecto de la especie animal donadora del inoculo ruminal, del tipo de dieta suministrada y de la adición de PEG sobre la producción de bases púricas ($\mu\text{mol}/\text{día}$) en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

	Especie animal			Dietas						HACO			interacción		EEM
	Ovino	Caprino	SE	HA	HACO	HACOP	HO	HOSUP	SD	Sin PEG	Con PEG	SP	ExD	ExP	
Adenina	210	220	NS	357 ^d	219 ^c	302 ^d	54,4 ^a	142 ^b	***	219 ^a	302 ^b	**	NS	NS	10,2
Guanina	433	463	NS	536 ^{b^c}	642 ^c	834 ^c	41,8 ^a	185 ^{ab}	***	642	834	NS	**	*	52,3
Totales BP	644	682	NS	893 ^b	863 ^b	1136 ^b	96,4 ^a	327 ^a	***	863	1136	NS	*	*	59,5

BP: bases púricas; HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada; las letras en superíndice, en una misma fila, representan diferencias significativas para cada valor debidas al efecto de la especie animal, del tipo de dieta o de la adición de PEG; SE: significación del efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal; SD: significación del efecto del tipo de dieta; SP: significación de la adición de PEG; ExD: interacción entre la especie animal donadora del inóculo ruminal y el tipo de dieta; ExP: interacción entre la especie animal donadora del inoculo ruminal y la adición de PEG; NS: no significativo ($P > 0,05$); *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; EEM: error estándar de la media.

4.4.8.3. Producción de ácidos grasos volátiles.

Los valores correspondientes a las producciones diarias de AVG totales e individuales y de sus eficiencias de producción así como de la producción de CHOD en los efluentes obtenidos en los ensayos con las distintas dietas experimentales aparecen en la Tabla 30.

El origen del inóculo ruminal (Tabla 30 bis) utilizado en los fermentadores no tiene efecto significativo sobre la producción diaria de los AGV, a excepción del ácido valérico ($P < 0,05$) cuya producción muestra valores superiores en los efluentes procedentes de fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino. La producción de CHOD es también significativamente ($P < 0,05$) superior en los efluentes cuando el inóculo ruminal procede de caprino. Los otros parámetros no son significativamente diferentes ($P > 0,05$) pero tienden a ser superiores cuando el inóculo ruminal procede de caprino.

El tipo de dieta suministrada al fermentador afecta significativamente a las producciones de AGV y de CHOD ($P < 0,001$). La sustitución de parte de heno de alfalfa por el concentrado disminuye la producción de AGV totales, la producción de ácido acético, la relación C2/C3 y la eficiencia de producción de AGV en los efluentes. La suplementación de la dieta HO con habas y cebada (dieta HOSUP) aumenta la producción de AGV totales e individuales, la producción de CHOD y la eficiencia de producción de AGV.

La adición de PEG a la dieta HACO (dieta HACOP) afecta significativamente a las producciones diarias de los ácidos acético ($P < 0,05$) y caproico ($P < 0,001$), a la relación C2/C3 y a la producción de CHOD ($P < 0,001$). Estos valores aumentan con la adición de PEG. Los valores correspondientes a la producción de AGV totales y del resto de los ácidos individuales así como a la eficiencia de producción de AGV totales tienden a ser superiores con la dieta HACOP que con HACO. La interacción "especie animal x dieta" resulta significativa para la producción de los ácidos isobutírico y caproico ($P < 0,05$) así como de isovalérico y valérico ($P < 0,01$). La interacción "especie animal x adición de PEG" sólo resulta significativa para las producciones de ácidos isobutírico, isovalérico y valérico ($P < 0,05$).

Tabla 30. Producción de ácidos grasos volátiles (mmol/día) y de carbohidratos digestibles totales (g/día) y eficiencia (mol AGV/kg CHOD) de la producción de los ácidos grasos volátiles en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

Dieta	EA	Acético	Propiónico	Isobutírico	Butírico	Isovalérico	Valérico	Caproíco	AGV Totales	CHOD	mol AGV/kg CHOD
HA	Ovino	68,4	19,0	0,47	9,48	0,193	2,29	0,275	100	20,5	4,81
	Caprino	90,4	27,7	0,62	14,0	0,303	3,25	0,665	137	23,4	5,83
HACO	Ovino	47,1	24,5	0,81	13,5	0,384	7,42	0,771	94,5	23,1	4,14
	Caprino	58,1	25,5	0,57	16,0	0,230	6,52	0,880	108	23,7	4,42
HACOP	Ovino	73,6	24,9	0,50	20,9	0,224	5,70	3,247	129	30,2	4,25
	Caprino	92,0	29,1	0,86	15,4	0,366	12,8	4,058	154	33,0	4,66
HO	Ovino	10,8	1,51	0,13	0,72	0,463	1,05	0,892	15,6	14,6	1,07
	Caprino	10,8	1,32	0,11	1,41	0,410	1,04	0,880	16,0	17,9	0,90
HOSUP	Ovino	46,8	16,1	1,10	11,0	2,029	2,25	2,920	82,2	18,1	4,56
	Caprino	41,9	12,8	1,04	8,59	2,311	1,84	2,346	70,8	20,5	3,47

EA: especie animal; HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada.

Tabla 30 bis. Efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal, del tipo de dieta suministrada y de la adición de PEG sobre la producción de ácidos grasos volátiles (mmol/día) y de carbohidratos totales digestibles (g/día) y eficiencia (mol/kg CHOD) de producción de los AGV en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

	Especie animal			Dietas						HACO			Interacción		EEM
	Ovino	Caprino	SE	HA	HACO	HACOP	HO	HOSUP	SD	Sin PEG	Con PEG	SP	ExD	ExP	
Acético	49,3	58,6	NS	79,3 ^{cd}	52,6 ^{bc}	82,8 ^d	10,8 ^a	44,4 ^b	***	52,6 ^a	82,8 ^b	*	NS	NS	4,190
Propiónico	17,2	19,3	NS	23,4 ^{bc}	25,0 ^c	27,0 ^c	1,42 ^a	14,4 ^b	***	25	27	NS	NS	NS	1,678
Isobutírico	0,601	0,64	NS	0,540 ^b	0,691 ^b	0,680 ^b	0,120 ^a	1,07 ^c	***	0,68	0,69	NS	*	*	0,038
Butírico	11,1	11,1	NS	11,7 ^{bc}	14,8 ^{bc}	18,1 ^c	1,07 ^a	9,79 ^b	***	14,8	18,1	NS	NS	NS	1,144
Isovalérico	0,659	0,726	NS	0,248 ^a	0,309 ^a	0,295 ^a	0,438 ^a	2,17 ^b	***	0,309	0,295	NS	**	*	0,020
Valérico	3,74 ^a	5,09 ^b	*	2,77 ^a	6,96 ^b	9,24 ^b	1,05 ^a	2,05 ^a	***	6,96	9,24	NS	**	*	0,498
Caproico	1,62	1,77	NS	0,470 ^a	0,825 ^a	3,65 ^c	0,887 ^a	2,63 ^b	***	0,825 ^a	3,65 ^b	***	*	NS	0,078
Totales	84,3	97,2	NS	119 ^{bc}	101 ^{bc}	142 ^c	15,8 ^a	76,5 ^b	***	101	142	NS	NS	NS	7,423
C2/C3	3,83	4,15	NS	3,44 ^a	2,10 ^a	3,05 ^a	8,26 ^b	3,11 ^a	***	2,10 ^a	3,05 ^b	***	NS	NS	0,154
CHOD	21,3 ^a	23,7 ^b	*	22,0 ^b	23,4 ^b	31,6 ^c	16,3 ^a	19,3 ^{ab}	***	23,4 ^a	31,6 ^b	***	NS	NS	0,718
mol AGV/kg CHOD	3,76	3,85	NS	5,32 ^b	4,28 ^b	4,46 ^b	0,982 ^a	4,02 ^b	***	4,28	4,46	NS	NS	NS	0,218

HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada; las letras en superíndice, en una misma fila, representan diferencias significativas para cada valor debidas al efecto de la especie animal, del tipo de dieta o de la adición de PEG; SE: significación del efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal; SD: significación del efecto del tipo de dieta; SP: significación de la adición de PEG; ExD: interacción entre la especie animal donadora del inóculo ruminal y del tipo de dieta; ExP: interacción entre la especie animal donadora del inóculo ruminal y de la adición de PEG; NS: no significativo ($P > 0,05$); *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; EEM: error estándar de la media.

4.4.8.4. Producción de nitrógeno total, amoniacal, no amoniacal, del ácido diaminopimélico y de bases púricas.

En la Tabla 31 aparecen los valores medios correspondientes a las producciones diarias de Nt, corregido para las pérdidas de amoníaco que tienen lugar durante la liofilización de los efluentes; de N-NH₃, NNA, N-DAPA y N-BP.

El efecto de la especie animal de la que procede el inóculo ruminal (Tabla 31 bis) no es significativo en ningún caso ($P > 0,05$). Los valores de N-NH₃, N-DAPA y N-BP son ligeramente superiores cuando los fermentadores eran inoculados con líquido ruminal de caprino.

El efecto del tipo de dieta suministrada resulta significativo ($P < 0,001$) en todos los casos. La suplementación de hoja de olivo con habas y cebada (dieta HOSUP) mejora la producción de nitrógeno.

La adición de PEG afecta significativamente a la producción de Nt y de NNA ($P < 0,05$). Estos valores son superiores en los fermentadores alimentados con la dieta HACOP. No obstante, las modificaciones de las producciones de N-NH₃, N-DAPA y N-BP que se producen con la adición de PEG no son significativas ($P > 0,05$), pero tienden a ser superiores en los efluentes de fermentadores alimentados con la dieta HACOP, a excepción de la producción de N-NH₃.

La interacción “especie animal x dieta” resulta significativa en todos los casos, para las producciones de N-NH₃, N-DAPA y N-BP ($P < 0,05$) y para las de Nt y NNA ($P < 0,01$).

La interacción “especie animal x adición de PEG” es significativa para todos los parámetros ($P < 0,05$) excepto para la de N-NH₃ ($P > 0,05$).

Tabla 31. Producción media diaria (mg/día) de nitrógeno total, amoniacal, no amoniacal, del ácido diaminopimélico y de bases púricas en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

Dieta	E A	*Nt	N-NH ₃	NNA	DAPA	N-BP
HA	Ovino	1201	53,7	1148	3,64	67,3
	Caprino	1171	68,9	1102	4,86	57,9
HACO	Ovino	1055	6,32	1048	4,44	39,9
	Caprino	1283	6,53	1277	5,79	80,9
HACOP	Ovino	1391	7,62	1384	6,83	87,9
	Caprino	1303	2,27	1301	5,28	71,3
HO	Ovino	236	1,68	234	1,16	6,87
	Caprino	193	1,62	191	0,76	6,60
HOSUP	Ovino	501	2,41	498	2,68	23,5
	Caprino	418	2,05	416	2,74	22,3

EA: especie animal; HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada; *: Producción de nitrógeno total corregida para las pérdidas de N-NH₃ que tiene lugar durante la liofilización de las muestras de efluentes.

Tabla 31 bis. Efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal, del tipo de dieta y de la adición de PEG sobre la producción media diaria (mg/día) de nitrógeno total, amoniacal, no amoniacal, ácido diaminopimélico y de las bases púricas en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculado con líquido ruminal de ovino o de caprino.

	Especie animal			Dieta						HACO			Interacción		EEM
	Ovino	Caprino	SE	HA	HACO	HACOP	HO	HOSUP	SD	Sin PEG	Con PEG	SP	ExD	ExP	
*Nt	877	874	NS	1186 ^{cd}	1169 ^c	1347 ^d	214 ^a	460 ^b	***	1169 ^a	1347 ^b	*	**	*	22,46
N-NH ₃	14,4	16,3	NS	61,3 ^b	6,42 ^a	4,95 ^a	1,65 ^a	2,23 ^a	***	6,42	4,95	NS	*	NS	0,863
NNA	862	857	NS	1125 ^c	1163 ^c	1342 ^d	213 ^a	457 ^b	***	1163 ^a	1342 ^b	*	**	*	22,25
N-DAPA	3,75	3,89	NS	4,25 ^{bc}	5,11 ^{cd}	6,06 ^d	0,962 ^a	2,71 ^b	***	5,11	6,06	NS	*	*	0,221
N-BP	45,1	47,8	NS	62,6 ^b	60,4 ^b	79,6 ^b	6,73 ^a	23,0 ^a	***	60,4	79,6	NS	*	*	4,189

HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada; *: producción de nitrógeno total corregida para las pérdidas de N-NH₃ que tienen lugar durante la liofilización de las muestras de efluentes; las letras en superíndice, en una misma fila, representan diferencias significativas para cada valor debidas al efecto de la especie animal, del tipo de dieta o de la adición de PEG; SE: significación del efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal; SD: significación del efecto del tipo de dieta; SP: significación de la adición de PEG; ExD: interacción entre la especie animal donadora del inóculo ruminal y del tipo de dieta; ExP: interacción entre la especie animal donadora del inóculo ruminal y de la adición de PEG; NS: no significativo (P > 0,05); *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001; EEM: error estándar de la media.

4.4.8.5. Producción de aminoácidos.

La producción media diaria de aminoácidos en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o caprino aparece en la Tabla 32.

La especie animal de la que procede el inóculo ruminal no afecta significativamente (Tabla 32 bis) a ninguno de los parámetros estudiados. Los valores de producción presentan una ligera elevación en los fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino en comparación con los que se inoculan con líquido ruminal de ovino, a excepción de la metionina.

Al contrario de lo que ocurre con la especie animal donadora del inóculo ruminal, el efecto del tipo de dieta es significativo ($P < 0,001$) en todos los casos. La dieta HACO da lugar a valores superiores a los de la dieta HA, a excepción de la lisina. La suplementación de hoja de olivo con habas y cebada (dieta HOSUP) produce valores superiores a los que proporciona la hoja sin suplementar (dieta HO)

El efecto de la adición de PEG resulta significativo para la producción de Met y AATOT ($P < 0,05$), Lis ($P < 0,001$) y AAE ($P < 0,01$). Todos los valores mejoran con la adición de PEG.

La interacción "especie animal x dieta" es significativa ($P < 0,05$) sólo para los valores de Lis y AAE.

Tabla 32. Producción media diaria de aminoácidos (mg Naa/ día) en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

Dieta	EA	Asp	Gli	Ser	Gli	His	Arg	Tre	Ala	Pro	Tir	DAPA	Val	Met	Cis	Ile	Leu	Fen	Lis	AAE	AAEA	AATOT
HA	Ovino	40,3	53,1	31,9	50,8	20,2	79,6	34,5	45,8	25,7	18,1	3,64	40,5	8,14	10,4	32,7	48,3	25,0	56,4	345	276	625
	Caprino	48,3	52,7	27,5	33,7	18,2	70,7	34,0	43,2	16,7	21,6	4,86	45,5	6,76	8,48	39,8	42,7	23,5	51,1	332	252	589
HACO	Ovino	54,9	63,0	30,6	42,4	20,8	83,4	34,1	43,0	25,6	18,9	4,44	42,2	7,09	8,28	32,4	44,6	23,1	41,9	330	287	621
	Caprino	59,4	76,2	34,7	40,5	23,6	93,9	39,2	49,9	24,4	46,4	5,79	53,1	8,27	11,0	42,5	49,7	26,2	51,8	388	343	737
HACOP	Ovino	65,0	85,1	35,6	43,8	22,6	95,5	40,8	52,4	27,7	21,5	6,83	57,7	11,0	13,0	49,6	56,8	30,9	68,7	434	344	784
	Caprino	61,7	82,3	39,4	54,5	24,5	101	44,2	52,3	34,9	21,4	5,28	49,5	11,2	10,9	39,2	55,6	28,9	66,6	421	357	784
HO	Ovino	12,3	12,1	8,28	12,4	5,52	21,7	8,50	12,7	8,18	4,60	1,16	9,24	0,60	0,88	7,63	11,4	6,46	2,76	73,9	71,6	147
	Caprino	10,5	9,70	6,47	9,51	4,80	17,1	6,60	9,95	6,17	3,58	0,76	7,23	0,52	0,72	5,63	8,34	4,76	3,12	58,1	56,6	115
HOSUP	Ovino	24,8	32,9	15,8	23,1	12,3	45,6	14,8	24,3	16,9	9,22	2,68	17,0	1,60	1,92	13,3	18,1	10,9	11,2	145	149	297
	Caprino	21,0	28,6	14,7	21,2	12,2	40,5	14,4	22,6	15,6	9,36	2,74	14,9	1,34	1,57	12,0	16,4	9,93	14,3	136	135	273

EA: especie animal; HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada; AAE: aminoácidos esenciales; AAENE: aminoácidos no esenciales; AATOT: aminoácidos totales.

Tabla 32 bis. Efecto de la especie animal donadora del inoculo ruminal, del tipo de dieta suministrada y de la adición de PEG sobre la producción media diaria de los aminoácidos (mg Naa/día) en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

	EA		SE	Dieta					SD	Sin PEG	HACO		Interacciones		EEM
	Ovino	Caprino		HA	HACO	HACOP	HO	HOSUP			Con PEG	SP	ExD	ExP	
Met	5,68	5,62	NS	7,45 ^{bc}	7,68 ^b	11,1 ^c	0,56 ^a	1,47 ^a	***	7,68 ^a	11,1 ^b	*	NS	NS	0,540
Lis	36,2	37,4	NS	53,8 ^c	46,8 ^c	67,7 ^d	2,95 ^a	12,7 ^b	***	46,8 ^a	67,7 ^b	***	*	NS	1,123
AAE	266	267	NS	339 ^c	359 ^c	427 ^d	66 ^a	140 ^b	***	359 ^a	427 ^b	**	*	NS	5,280
AAENE	225	228	NS	264 ^c	314 ^{cd}	350 ^d	64 ^a	142 ^b	***	314	350	NS	NS	NS	8,695
AATOT	494	499	NS	607 ^c	678 ^{cd}	784 ^d	131 ^a	285 ^b	***	678 ^a	784 ^b	*	NS	NS	13,60

EA: especie animal; HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada; Met: metionina; Lis: lisina; AAE: aminoácidos esenciales; AAENE: aminoácidos no esenciales; AATOT: aminoácidos totales; las letras en superíndice, en una misma fila, representan diferencias significativas para cada valor debidas al efecto de la especie animal o del tipo de la dieta; SE: significación del efecto de la especie animal donadora del inoculo ruminal; SD: significación del efecto del tipo de dieta; SP: significación de la adición de PEG; ExD: interacción entre la especie animal donadora del inoculo ruminal y del tipo de dieta; ExP: interacción entre la especie animal donadora del inoculo ruminal y la adición de PEG; NS: no significativo ($P > 0,05$); *: $P < 0,05$; ***: $P < 0,001$; EEM: error estándar de la media.

4.4.9. Composición de los extractos bacterianos aislados.

4.4.9.1. Composición aminoacídica.

El contenido porcentual de Naa total y la composición de aminoácidos individuales de las diferentes fracciones bacterianas, aisladas en los efluentes y en los contenidos de los fermentadores del último día del correspondiente ensayo aparecen en las Tablas 33a, 33b y 33c.

Los valores porcentuales de N aminoacídico en el nitrógeno bacteriano oscilan entre 35,2 de la fracción BAS obtenidas en fermentadores inoculados con líquido ruminal de ovino y alimentados con la dieta HOSUP hasta 76,7 de la fracción BAL obtenidas en fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino y alimentados con la dieta HA. En general, los valores individuales de los aminoácidos no parecen muy diferentes para una misma dieta.

Tabla 33a. Composición en aminoácidos (g N-aa/100 g N bact) de las bacterias aisladas de los efluentes (BE) y de los contenidos de los fermentadores (BAL y BAS) alimentados con heno de alfalfa e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

Especie animal Fracción	Ovino			Caprino		
	BE	BAS	BAL	BE	BAS	BAL
Asp	6,14	6,07	4,85	6,51	5,52	8,39
Gli	6,02	5,17	3,73	3,48	5,96	5,07
Ser	3,89	3,28	4,22	3,86	3,97	4,29
Gli	6,31	5,08	6,27	5,57	5,94	6,47
His	3,31	2,89	3,37	2,50	3,58	3,32
Arg	8,79	8,13	9,99	8,99	9,29	10,7
Tre	4,16	3,66	4,79	4,37	4,12	4,61
Ala	7,26	5,85	7,21	6,81	6,83	7,70
Pro	2,64	2,32	2,60	2,37	2,72	2,80
Tir	2,56	2,16	2,31	2,04	2,52	2,50
DAPA	0,843	0,741	0,742	0,662	0,676	0,679
Val	4,03	3,38	4,69	3,92	3,78	3,99
Met	0,480	0,340	0,340	0,328	0,430	0,483
Cis	0,584	0,441	0,325	0,314	0,460	0,527
Ile	3,55	2,85	4,02	3,41	3,07	3,35
Leu	3,77	3,32	4,02	3,72	3,69	3,87
Fen	2,48	2,10	2,68	2,33	2,29	2,20
Lis	6,35	5,23	6,78	6,05	6,02	5,78
Naa total (%N bact)	73,18	63,02	72,95	67,22	70,86	76,73

BE: bacterias aisladas de los efluentes; BAL: bacterias asociadas a la fase líquida del contenido de los fermentadores; BAS: bacterias asociadas a la fase sólida del contenido de los fermentadores.

Tabla 33b. Composición en aminoácidos (g N-aa/100 g N bact) de las bacterias aisladas de los efluentes (BE) y de los contenidos de los fermentadores (BAL y BAS) alimentados con las dietas HACO y HACOP e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

Dieta	HACO						HACOP					
	EA	Ovino	Ovino	Ovino	Caprino	Caprino	Caprino	Ovino	Ovino	Ovino	Caprino	Caprino
Fracción	BE	BAS	BAL	BE	BAS	BAL	BE	BAS	BAL	BE	BAS	BAL
Asp	8,30	5,39	7,69	8,30	6,63	7,69	6,23	4,31	6,28	5,91	3,87	6,30
Gli	5,93	5,01	6,47	5,93	5,82	6,47	6,08	6,14	5,69	5,67	5,13	6,10
Ser	4,14	3,22	3,43	4,14	3,53	3,43	3,93	3,88	3,72	3,73	3,43	3,98
Gli	5,88	4,51	5,40	5,88	4,83	5,40	5,10	5,38	4,91	4,79	4,75	5,65
His	3,72	2,78	3,81	3,72	3,31	3,81	3,66	3,35	3,32	3,55	3,31	2,93
Arg	11,0	7,92	9,39	11,0	8,60	9,39	8,56	9,24	8,04	8,16	8,28	9,40
Tre	4,21	3,09	3,64	4,21	3,28	3,64	3,91	3,60	3,63	3,73	3,06	3,94
Ala	6,62	5,31	4,99	6,62	4,41	4,99	5,32	5,29	4,85	5,13	4,65	5,26
Pro	2,73	2,14	2,72	2,73	2,31	2,72	2,53	2,93	2,39	2,46	2,48	2,70
Tir	1,85	1,52	2,09	1,85	2,12	2,09	2,23	2,05	2,03	1,87	1,72	1,48
DAPA	0,595	0,714	0,885	0,595	0,720	0,885	0,762	0,729	0,745	0,871	0,743	0,774
Val	3,58	2,83	3,53	3,58	2,89	3,53	3,55	3,34	3,23	3,11	2,90	3,26
Met	0,507	0,243	0,534	0,507	0,438	0,534	0,554	0,434	0,344	0,463	0,344	0,442
Cis	0,397	0,288	0,475	0,397	0,405	0,475	0,386	0,502	0,270	0,374	0,444	0,339
Ile	2,89	2,32	3,72	2,89	3,02	3,72	4,32	3,82	3,67	4,09	3,05	3,48
Leu	3,66	3,17	4,90	3,66	4,07	4,90	5,41	5,49	4,98	5,24	4,59	5,27
Fen	2,09	1,86	2,59	2,09	2,10	2,59	2,99	2,73	2,65	2,84	2,22	2,36
Lis	5,55	5,29	6,31	5,55	5,00	6,31	7,28	6,28	6,14	6,10	5,33	7,94
Naa total (%N bact)	73,68	57,60	72,58	73,68	63,47	72,58	72,80	69,49	66,90	68,09	60,30	71,59

EA: especie animal; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; BE: bacterias aisladas de los efluentes; BAL: bacterias asociadas a la fase líquida del contenido de los fermentadores; BAS: bacterias asociadas a la fase sólida del contenido de los fermentadores.

Tabla 33c. Composición en aminoácidos (g N-aa/100 g N bact) de las bacterias aisladas de los efluentes (BE) y de los contenidos de los fermentadores (BAL y BAS) alimentados con las dietas HO y HOSUP e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

Dieta EA	HO						HOSUP					
	Ovino BE	Ovino BAS	Ovino BAL	Caprino BE	Caprino BAS	Caprino BAL	Ovino BE	Ovino BAS	Ovino BAL	Caprino BE	Caprino BAS	Caprino BAL
Asp	2,94	3,38	2,85	3,81	2,56	4,81	4,94	3,14	5,47	6,02	3,86	7,00
Gli	2,56	3,04	2,37	4,50	3,33	3,37	4,81	3,39	5,14	4,44	2,82	5,69
Ser	2,48	2,22	2,18	3,28	2,04	2,51	2,58	1,62	2,75	2,55	1,48	3,30
Gli	3,36	2,83	2,66	4,27	1,93	3,37	2,51	1,82	3,31	2,43	2,40	3,63
His	2,14	2,38	3,65	2,70	1,70	2,84	2,26	1,01	1,51	2,18	1,15	2,01
Arg	6,16	6,29	6,53	8,38	5,38	7,07	6,71	4,21	6,73	5,90	5,77	7,91
Tre	2,79	2,17	2,56	3,45	2,17	3,16	3,06	1,95	3,52	2,87	2,52	4,04
Ala	3,49	3,20	3,10	4,29	3,25	4,15	4,13	2,72	4,75	3,89	3,75	5,54
Pro	2,28	1,69	1,92	2,65	1,12	1,97	1,32	0,85	1,31	1,26	1,51	1,61
Tir	1,34	1,23	1,76	1,65	1,45	2,38	2,17	1,33	2,28	2,01	1,48	2,79
DAPA	0,451	0,588	0,832	0,491	0,440	0,986	0,639	0,460	0,889	0,680	0,601	0,939
Val	2,14	2,10	2,05	2,79	3,73	3,94	4,37	2,78	4,69	3,85	3,95	5,65
Met	0,224	0,276	0,141	0,331	0,227	0,150	0,348	0,355	0,392	0,412	0,317	0,411
Cis	0,286	0,318	0,137	0,315	0,317	0,258	0,305	0,440	0,464	0,374	0,472	0,582
Ile	2,15	1,92	1,79	2,39	3,21	3,21	4,11	2,43	4,25	3,57	3,86	5,07
Leu	3,88	3,20	2,72	4,41	3,38	3,66	3,90	2,35	3,97	3,51	3,86	4,73
Fen	1,69	1,53	1,60	1,86	1,80	2,47	2,28	1,27	2,26	2,15	2,38	2,78
Lis	1,28	2,17	2,56	1,80	1,71	3,45	5,04	3,09	5,89	4,24	5,05	6,58
Naa total (%N bact)	41,66	40,55	41,41	53,37	39,75	53,74	55,49	35,22	59,58	52,33	47,22	70,25

EA: especie animal; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada; BE: bacterias aisladas de los efluentes; BAL: bacterias asociadas a la fase líquida del contenido de los fermentadores; BAS: bacterias asociadas a la fase sólida del contenido de los fermentadores.

4.4.9.2. Composición en bases púricas.

El contenido en bases púricas y en nitrógeno así como la relación BP:N de las diferentes fracciones bacterianas, aisladas en los efluentes y en los contenidos de los fermentadores, alimentados con las diferentes dietas experimentales aparecen en la Tabla 34.

El contenido en Nt de las diferentes poblaciones microbianas oscila entre 0,88 y 5,88 g/100 g MS, respectivamente para BAS de fermentadores con inóculo de caprino alimentados con hoja de olivo y BAL de los inoculados con líquido ruminal de ovino alimentados con la dieta HACO.

Los contenidos en bases púricas totales son superiores en BAL que en BAS. La concentración en bases púricas totales de BE oscilan entre 9,64 y 61,85 $\mu\text{mol/g}$ MS para las

dietas HO y HA, respectivamente. La concentración de adenina y guanina es superior en la fracción BAL que en la de BAS.

En general, la relación BP:N de las BE presenta un valor intermedio entre los encontrados en BAL y BAS. La relación BP:N presenta valores superiores en las bacterias aisladas de los contenidos de los fermentadores alimentados con la dieta HOSUP.

Tabla 34. Composición en bases púricas ($\mu\text{mol/g MS}$) y en nitrógeno (g/100 g MS) y relación bases púricas: nitrógeno bacteriano ($\mu\text{mol/mg}$) de las bacterias aisladas en los contenidos de los fermentadores (BAL, BAS) y en efluentes (BE).

Dieta	EA	Adenina			Guanina			Base púricas			N			BP:N		
		BAL	BAS	BE	BAL	BAS	BE	BAL	BAS	BE	BAL	BAS	BE	BAL	BAS	BE
HA	Ovino	13,2	12,8	23,5	24,0	19,8	41,6	37,2	32,5	65,2	4,67	3,86	5,12	0,797	0,843	1,273
	Caprino	11,2	11,3	23,6	21,4	19,1	34,9	32,6	30,4	58,5	4,65	3,99	4,38	0,702	0,762	1,355
HACO	Ovino	10,0	7,87	8,88	20,1	15,8	18,0	30,1	23,7	26,9	5,88	5,25	4,38	0,512	0,452	0,614
	Caprino	8,99	6,79	8,55	18,2	14,1	19,1	27,2	20,9	27,7	5,75	5,35	4,74	0,473	0,391	0,584
HACOP	Ovino	6,49	4,48	4,61	15,0	14,9	18,1	21,5	19,3	22,7	5,27	4,38	4,47	0,408	0,441	0,508
	Caprino	6,59	4,73	4,60	15,4	14,6	18,7	22,0	19,4	23,3	4,88	4,63	4,80	0,450	0,418	0,486
HO	Ovino	3,65	1,12	3,89	3,78	1,21	3,99	7,43	2,33	7,88	1,41	0,99	1,73	0,528	0,235	0,456
	Caprino	3,47	2,24	5,92	3,58	3,61	5,51	7,05	5,85	11,4	1,41	0,88	1,80	0,501	0,662	0,635
HOSUP	Ovino	17,5	16,4	14,71	26,4	26,4	25,1	43,9	42,8	39,8	3,90	3,81	3,85	1,127	1,125	1,035
	Caprino	18,8	17,0	13,43	27,3	26,0	21,7	46,1	43,0	35,1	3,93	3,47	3,24	1,174	1,240	1,081

EA: especie animal, BAL: bacterias asociadas a la fase líquida de los contenidos de los fermentadores; BAS: bacterias asociadas a la fase sólida de los contenidos de los fermentadores; BE: bacterias aisladas de los efluentes; N: nitrógeno; BP:N: la relación bases púricas: nitrógeno.

4.4.10. Producción de nitrógeno bacteriano.

En la Tabla 35 aparecen los valores medios de las producciones diarias y de las eficiencias de producción de las fracciones nitrogenadas bacterianas (total y aminoacídica) correspondientes a los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales.

En la Tabla 35 bis, la especie animal donadora del inóculo ruminal no afecta significativamente a ningún de los parámetros de producción ni a sus eficiencias.

El tipo de dieta suministrada al fermentador afecta significativamente ($P < 0,001$) a todos los parámetros estudiados. La sustitución de parte del heno de alfalfa por concentrado aumenta la producción de nitrógeno bacteriano total (1,4,7) y aminoacídico (2) así como la eficiencia de producción del nitrógeno bacteriano (3). La producción de nitrógeno bacteriano total y aminoacídico, es muy elevada en los fermentadores alimentados con hoja de olivo suplementada (dieta HOSUP), en comparación con lo que ocurre en aquellos fermentadores a los que se suministró la dieta HO.

La adición de PEG tiene un efecto significativo sobre la producción de Nt de BAS (4) y N bacteriano púrico (7) ($P < 0,05$) y la producción de N-aa de BAS (5) ($P < 0,001$), que son muy elevados con la dieta HACOP, en comparación con la dieta HACO.

La interacción “especie animal x dieta” afecta significativamente a todos los parámetros considerados con excepción de la eficiencia de producción de Naa de BAS/kg CHOD (columna 6).

La interacción “especie animal x adición de PEG” es significativa para todos los parámetros estudiados, excepto la producción de Nt bacteriano (1).

Tabla 35. Producción media diaria y eficiencias de producción de nitrógeno bacteriano total y aminoacídico en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

Dieta	EA	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
		N Bact, mg/día	Naa Bact, mg/día	g Naa Bact/kg CHOD	N BAS, mg/día	Naa BAS, mg/día	g Naa BAS/kg CHOD	N Bact, mg/día
HA	Ovino	431	316	15,6	1086	684	34,4	754
	Caprino	734	493	21,3	1040	737	31,8	610
HACO	Ovino	746	550	24,7	960	553	24,7	929
	Caprino	806	594	25,5	1170	743	31,9	1979
HACOP	Ovino	897	653	21,9	1257	874	29,1	2468
	Caprino	606	413	12,5	1184	714	21,6	2094
HO	Ovino	257	107	7,37	68,2	27,7	1,90	215
	Caprino	155	82,9	4,67	46,0	18,3	1,03	148
HOSUP	Ovino	419	232	12,9	302	106	5,94	292
	Caprino	403	211	10,4	271	128	6,27	281

EA: especie animal; HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada.

(1) Calculado a partir de la relación DAPA/N en los efluentes de los fermentadores.

(2) Calculado a partir de la producción de nitrógeno bacteriano de los efluentes (1) y de sus correspondientes proporciones de Naa bacteriano.

(3) Eficiencia de producción de Naa bacteriano, expresado en función de las producciones de CHOD.

(4) Calculado a partir de la diferencia entre la producción de NNA y las correspondientes de N-FAD en los efluentes (CARRO y MILLER, 1999).

(5) Calculado a partir de la producción de nitrógeno bacteriano (columna 4) y de los correspondientes proporciones de Naa de BAS.

(6) Eficiencia de producción de Naa de BAS, expresado en función de las producciones de CHOD.

(7) Calculado a partir de la relación N-BP/N en los efluentes de los fermentadores.

Tabla 35 bis. Efecto de la especie animal donadora del inoculo ruminal, del tipo de dieta suministrada y de la adición de PEG sobre la producción media diaria de las distintas fracciones nitrogenadas bacterianas y sobre las eficiencias de producción en los efluentes de los fermentadores alimentados con las distintas dietas experimentales e inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

	Especie animal			Dieta						HACO		Interacciones			EEM
	Ovino	Caprino	SE	HA	HACO	HACOP	HO	HOSUP	SD	Sin PEG	Con PEG	SP	ExD	ExP	
(1) N Bat, mg/día	549	541	NS	582 ^{bc}	775 ^c	751 ^c	206 ^a	411 ^b	***	775	751	NS	***	NS	20,16
(2) Naa Bact, mg/día	371	358	NS	404 ^b	572 ^c	533 ^{bc}	95,0 ^a	221 ^b	***	650	532	NS	***	**	15,45
(3) Naa Bact, g/kg CHOD	16,5	16,2	NS	18,5 ^b	25,1 ^c	17,2 ^b	6,02 ^a	11,6 ^{ab}	***	25,1 ^b	17,2 ^a	**	*	*	0,855
(4) N BAS, mg/día	734	742	NS	1063 ^c	1065 ^c	1220 ^d	57,1 ^a	286 ^b	***	1065 ^a	1220 ^b	*	*	*	13,92
(5) Naa BAS, mg/día	449	467	NS	710 ^{cd}	647 ^c	793 ^d	22,9 ^a	117 ^b	***	648 ^a	794 ^b	***	***	***	8,420
(6) Naa BAS, g/kg CHOD	19,1	18,5	NS	33,1 ^b	28,3 ^b	25,4 ^b	1,47 ^a	6,11 ^a	***	28,3	25,4	NS	NS	*	0,782
(7) N Bact, mg/día	931	1022	NS	682 ^{ab}	1453 ^b	2280 ^c	182 ^a	286 ^a	***	1453 ^a	2281 ^b	*	*	*	16,45

HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada; las letras en superíndice, en una misma fila, representan diferencias significativas para cada valor debidas al efecto de la especie animal, del tipo de dieta o de la adición de PEG; SE: significación del efecto de la especie animal donadora del inóculo ruminal; SD: significación del efecto del tipo de dieta; ExD: interacción entre la especie animal donadora del inóculo ruminal y del tipo de dieta; ExP: interacción entre la especie animal donadora del inoculo ruminal y de la adición de PEG; NS: no significativo ($P > 0,05$); *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; EEM: error estándar de la media.

4.5. POTENCIAL DE LAS TÉCNICAS DE SIMULACIÓN PARA ESTIMAR LOS RESULTADOS *IN VIVO*.

4.5.1. Degradabilidad ruminal.

En la Tabla 36, aparecen las ecuaciones de correlación ($Y = A + B \cdot X$), que han resultado significativas, entre los valores de degradabilidad ruminal obtenidos *in situ* (YÁÑEZ RUIZ, 2003) y en los fermentadores en el presente trabajo con las mismas dietas experimentales.

Las ecuaciones de correlación entre los valores de la fracción potencialmente degradable de la PB del concentrado y de la degradabilidad potencial de la MS y la fracción (*b*) de la PB de las habas, obtenidos *in situ* y en los fermentadores alimentados con las dietas HACOP y HOSUP, respectivamente, son muy significativas ($P < 0,01$) y los coeficientes de correlación son positivos y muy elevados ($r = 0,93303, 0,96630$ y $0,93520$ para la fracción (*b*) de la PB del concentrado y, de la DP de la MS y de la fracción (*b*) de la PB de las habas, respectivamente).

Tabla 36. Correlaciones ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de degradabilidad ruminal de la materia seca y de la proteína bruta de los distintos alimentos por separados obtenidos mediante ensayos *in situ* e *in vitro* suministrando las mismas dietas experimentales. Las dos especies (ovina y caprina) conjuntas.

Dieta	AI	Y, <i>in situ</i>	n	A	B	X, <i>in vitro</i>	r	RSD	SE
HA	HA	DPB <i>a</i> , %	6	12,3396	0,45260	DPB <i>a</i> , %	0,89594	0,364413	*
HACO	HA	DPPB, %	6	82,5119	0,1150	DPPB, %	0,83566	0,620408	*
HACO	HACO	DEPB, %	6	-105,279	2,56861	DEPB, %	0,87739	0,932181	*
HACOP	CO	DPB <i>b</i> , %	6	36,7814	0,30080	DPB <i>b</i> , %	0,93303	1,749	**
HACOP	HACO	DPPB, %	6	-36,5587	1,64218	DPPB, %	0,83919	1,27544	*
HOSUP	Habas	DPMS, %	6	31,9663	0,512172	DPMS, %	0,96630	0,594833	**
HOSUP	Habas	DPB <i>b</i> , %	6	-0,76521	1,16796	DPB <i>b</i> , %	0,93520	2,12066	**
HOSUP	Habas	DPPB, %	6	-94,4781	1,87756	DP PB, %	0,84634	4,09295	*
HOSUP	Cebada	DEPB, %	6	-111,602	3,11011	DE PB, %	0,83105	3,02794	*

AI: alimento incubado; HA: heno de alfalfa; CO: concentrado; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada; *a*: fracción rápidamente degradable; *b*: fracción potencialmente degradable; *c*: velocidad de degradación de la fracción *b*; DP, % = $a+b$: degradabilidad potencial; DE, % = $a + (b \cdot c)/(c+k)$: degradabilidad efectiva; DMS, %: degradabilidad de la materia seca; DPB, %: degradabilidad de la proteína bruta; r: coeficiente de correlación; n: número de repeticiones; SE: significación estadística; *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; RSD: desviación estándar residual.

En la Tabla 37, aparecen las ecuaciones de correlación lineal entre los valores de degradabilidad obtenidos *in situ* y en los fermentadores para ovino y caprino y para los

distintos alimentos incubados. Esas ecuaciones son muy significativas con un elevado nivel de significación ($P < 0,001$) salvo para los valores de la fracción (b) obtenidos entre caprino y en *in vitro* ($P < 0,05$). Parece que los valores de degradabilidad de la proteína bruta se estiman mejor que los de degradabilidad de la materia seca, con un coeficiente de correlación ($r = 0,671057$ y $0,850042$ para las ecuaciones derivadas de la degradabilidad de la MS y de la PB, respectivamente).

Tabla 37. Correlaciones ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de degradabilidad ruminal de la materia seca y de la proteína bruta de todos los alimentos conjuntos obtenidos mediante ensayos *in situ* e *in vitro*, suministrando las mismas dietas experimentales. Diferencias entre ovino y caprino.

EA	Y, <i>in situ</i>	n	A	B	X, <i>in vitro</i>	r	RSD	SE
	DMS				DMS			
Ovino	a , %	30	-7,11895	1,13186	a , %	0,729794	9,58892	***
Caprino	a , %	30	-12,3672	1,22769	a , %	0,798803	8,53695	***
Ovino	b , %	30	21,5685	0,518729	b , %	0,710922	7,86661	***
Caprino	b , %	30	26,4717	0,361585	b , %	0,414395	11,9516	*
Ovino	DP, %	30	49,5004	0,406943	DP, %	0,63239	7,78004	***
Ovino	DE, %	30	17,0768	0,895238	DE, %	0,68894	10,2653	***
Caprino	DE, %	30	35,5121	0,535458	DE, %	0,722158	6,28156	***
	DPB				DPB			
Ovino	a , %	30	-20,7912	1,25951	a , %	0,887757	7,126221	***
Caprino	a , %	30	-16,8987	1,2158	a , %	0,857037	8,05981	***
Ovino	b , %	30	15,615	0,773443	b , %	0,805568	8,19047	***
Caprino	b , %	30	25,0203	0,611872	b , %	0,695773	8,57913	***
Ovino	DP, %	30	-10,2444	1,1436	DP, %	0,876874	10,9693	***
Caprino	DP, %	30	20,7146	0,849311	DP, %	0,814379	10,1883	***
Ovino	DE, %	30	-28,7732	1,5807	DE, %	0,963629	5,55159	***
Caprino	DE, %	30	-10,8874	1,34678	DE, %	0,899315	8,4498	***

CO: concentrado; HACO: heno de alfalfa + concentrado; a : fracción rápidamente degradable; b : fracción potencialmente degradable; c : velocidad de degradación de la fracción b ; DP = $a+b$: degradabilidad potencial; DE, % = $a + (b \cdot c)/(c+k)$: degradabilidad efectiva; DMS, %: degradabilidad de la materia seca; DPB, %: degradabilidad de la proteína bruta. SE: significación estadística; *: $P < 0,05$; ***: $P < 0,001$; RSD: desviación estándar residual; r = coeficiente de correlación; n = número de repeticiones.

En la Tabla 38, aparecen las ecuaciones de correlación entre los valores de degradabilidad ruminal obtenidos *in situ* y en los fermentadores. Se han separado los ingredientes de mediana-buena calidad de los de baja calidad, independientemente de la especie animal. En este caso, todas las ecuaciones de correlación de degradabilidad entre los valores *in situ* e *in vitro* para los alimentos de baja calidad (hoja de olivo) no resultaron significativas. Las ecuaciones de correlación entre los valores de la fracción (b) de la MS y de la PB obtenidos *in situ* y en los fermentadores parecen ser mejor estimados en

comparación con los valores de las otras ecuaciones, con un coeficiente de correlación muy elevado ($r = 0,83007$).

Tabla 38. Correlaciones ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de degradabilidad ruminal de la materia seca y de la proteína bruta de los alimentos (HA; CO; HACO; habas y cebada) obtenidos mediante ensayos *in situ* e *in vitro* suministrando las dietas (HA; HACO; HACOP y HOSUP).

Y, <i>in situ</i>	n	A	B	X, <i>in vitro</i>	r	RSD	SE
DMS		DMS					
a, %	54	-4,68759	1,06622	a, %	0,646459	10,5403	***
b, %	54	13,7043	0,764383	b, %	0,84907	6,39143	***
c, h ⁻¹	54	0,057651	0,685901	c, h ⁻¹	0,568411	0,05636	***
DPB		DPB					
a, %	54	-3,57728	0,964556	a, %	0,711153	8,18771	***
b, %	54	23,1669	0,637324	b, %	0,81107	5,46197	***

CO: concentrado; HACO: heno de alfalfa + concentrado; a: fracción rápidamente degradable; b: fracción potencialmente degradable; c: velocidad de degradación de la fracción b; DP, % = a+b: degradabilidad potencial; DMS, %: degradabilidad de la materia seca; DPB, %: degradabilidad de la proteína bruta. SE: significación estadística; ***: $P < 0,001$; n: número de repeticiones; r: coeficiente de correlación; RSD: desviación estándar residual.

En la Tabla 39, las ecuaciones de correlación entre los valores de degradabilidad obtenidas *in situ* e *in vitro* son muy significativas ($P < 0,001$). El coeficiente de correlación es muy elevado con las ecuaciones que derivan de la PB en comparación con las que derivan de la MS. Por lo tanto, parece que los valores de degradabilidad de la PB son mejores estimados *in vitro* en comparación con los de la MS.

Tabla 39. Correlaciones ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de degradabilidad ruminal de la materia seca y de la proteína bruta de todos los alimentos conjuntamente obtenidos mediante ensayos *in situ* e *in vitro* suministrando las mismas dietas experimentales.

Y, <i>in situ</i>	n	A	B	X, <i>in vitro</i>	r	RSD	SE
DMS				DMS			
a, %	60	-5,06272	1,07364	a, %	0,694672	9,98494	***
b, %	60	20,6298	0,570568	b, %	0,710671	8,43381	***
c, h ⁻¹	60	0,0469446	0,737883	c, h ⁻¹	0,570271	0,0583105	***
DP, %	60	59,8317	0,257182	DP, %	0,533339	6,45088	***
DE, %	60	22,8033	0,773262	DE, %	0,75678	7,64294	***
DPB				DPB			
a, %	60	-16,6724	1,19539	a, %	0,841688	8,26604	***
b, %	60	17,8915	0,78487	b, %	0,854453	6,62358	***
DP, %	60	5,13104	1,00136	DP, %	0,846288	10,7057	***
DE, %	60	-18,3516	1,44072	DE, %	0,914898	7,98685	***

a: fracción rápidamente degradable; b: fracción potencialmente degradable; c: velocidad de degradación de la fracción b; DP, % = a+b: degradabilidad potencial; DE, % = $a + (b \cdot c) / (c + k)$: degradabilidad efectiva, DMS, %: degradabilidad de la materia seca; DPB, %: degradabilidad de la proteína bruta. SE: significación estadística; ***: $P < 0,001$; r: coeficiente de correlación; n: número de repeticiones; RSD: desviación estándar residual.

4.5.2. Concentración de amonio.

Las ecuaciones de correlación lineal obtenidas entre los valores de la concentración de amonio obtenidos *in vivo* en nuestro grupo (YÁÑEZ RUIZ, 2003) y en el presente trabajo con fermentadores aparecen en la Tabla 40. Las correlaciones son significativas ($P < 0,01$) y el coeficiente de correlación de ambas ecuaciones es positivo ($r = 0,657276$ y $0,653686$, para ovino y caprino, respectivamente).

Tabla 40. Ecuaciones de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de la concentración amoniacal obtenidos mediante ensayos *in vivo* y en los fermentadores suministrando las distintas dietas experimentales (HA; HACO; HACOP; HOSUP y HO). Diferencias entre ovino y caprino.

EA	Y, <i>in vivo</i>	n	A	B	X, <i>in vitro</i>	r	RSD	SE
Ovino	Concentración NH ₃ -N, mg/100 ml	16	9,09003	3,99972	Concentración NH ₃ -N mg/100 ml	0,657276	9,76968	**
Caprino	Concentración NH ₃ -N, mg/100 ml	16	7,54876	2,21903	Concentración NH ₃ -N, mg/100 ml	0,653686	6,78636	**

EA: especie animal; n: número de repeticiones; r: coeficiente de correlación; RSD: desviación estándar residual; SE: significación estadística; **: $P < 0,01$.

Puesto que no hay diferencias significativas entre los valores de la concentración de amonio obtenidos entre ovino y caprino, se consideran los datos conjuntamente, pero se han separado las dietas experimentales. De una parte se han considerado las dietas de

mediana-buena calidad y, de otra parte, las dietas de mala calidad (HO) para obtener las ecuaciones de correlación entre los valores de la concentración de amonio derivados de los ensayos realizados *in vivo* e *in vitro* (Tabla 41). Se ha observado que sólo con las dietas de mediana-buena calidad (HA, HACO, HACOP y HOSUP) se obtienen una correlación significativa ($P < 0,01$) y positiva ($r = 0,57316$).

Tabla 41. Ecuaciones de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de la concentración amoniacal obtenidos mediante ensayos *in vivo* y en los fermentadores suministrando las dietas experimentales (HA; HACO, HACOP y HOSUP).

Y, <i>in vivo</i>	n	A	B	X, <i>in vitro</i>	r	RSD	SE
Concentración NH ₃ -N, mg/100 ml	26	11,646	2,31621	Concentración NH ₃ -N, mg/100 ml	0,57316	8,23297	**

n: número de repeticiones; r: coeficiente de correlación; RSD: desviación estándar residual; SE: significación estadística; **: $P < 0,01$.

Puesto que sólo con las dietas de mediana-buena calidad se obtiene una correlación significativa, se ha considerado los datos de todas las dietas conjuntamente y también de las especies ovina y caprina conjuntamente. Se obtiene la ecuación de correlación general entre los valores obtenidos *in vivo* e *in vitro* (Tabla 42). Esta correlación resulta significativa ($P < 0,01$) y con un coeficiente de correlación positivo ($r = 0,613293$).

Tabla 42. Ecuaciones de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de la concentración amoniacal obtenidos mediante ensayos *in vivo* y en fermentadores suministrando las distintas dietas experimentales.

Y, <i>in vivo</i>	n	A	B	X, <i>in vitro</i>	r	RSD	SE
Concentración NH ₃ -N, mg/100 ml	32	8,58418	2,84469	Concentración NH ₃ -N, mg/100 ml	0,613293	8,64597	**

n: número de repeticiones; r: coeficiente de correlación; RSD: desviación estándar residual; SE: significación estadística; **: $P < 0,01$.

4.5.3. Concentración de ácidos grasos volátiles totales.

En la Tabla 43, aparecen las ecuaciones de correlación entre los valores de concentración de AGV totales obtenidos *in vivo* y en los fermentadores, para ovino y caprino. Las correlaciones son significativas ($P < 0,001$ y $0,01$ para los valores de la concentración de AGV totales derivados de los ensayos realizados en ovino y caprino respectivamente) y positivas ($r = 0,858592$ y $0,737028$ para ovino y caprino, respectivamente).

Tabla 43. Ecuaciones de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de concentración de AGV totales obtenidos mediante ensayos *in vivo* y en fermentadores suministrando las distintas dietas experimentales. Diferencias entre ovino y caprino.

EA	Y, <i>in vivo</i>	n	A	B	X, <i>in vitro</i>	r	RSD	SE
Ovino	Concentración AGV totales mmol/l	16	26,6991	0,46249	Concentración AGV totales mmol/l	0,858592	12,8577	***
Caprino	Concentración AGV totales mmol/l	16	36,5902	0,29609	Concentración AGV totales mmol/l	0,737028	16,5371	**

EA: especie animal; n: número de repeticiones; r: coeficiente de correlación; RSD: desviación estándar residual; SE: significación estadística; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

Puesto que no aparecen diferencias significativas entre la concentración de AGV en ovino y caprino, se consideran los datos conjuntamente separando las dietas de mediana buena calidad (HOSUP; HA; HACO y HACOP) (Tabla 44) de las de baja calidad (HO) (Tabla 45). La ecuación de correlación sólo resulta significativa ($P < 0,05$) para la dieta HO, con un coeficiente de correlación positivo y elevado ($r = 0,900917$).

Tabla 44. Ecuación de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de concentración de AGV totales obtenidos *in vivo* y en los fermentadores alimentados con las dietas experimentales (HA; HACO; HACOP y HOSUP).

Y, <i>in situ</i>	n	A	B	X, <i>in vitro</i>	r	RSD	SE
Concentración AGV totales mmol/l	26	59,9704	0,149013	Concentración AGV totales mmol/l	0,381465	13,736	0,054

n: número de repeticiones; r: coeficiente de correlación; RSD: desviación estándar residual; SE: significación estadística; ($P > 0,05$).

Tabla 45. Ecuación de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de la concentración de AGV totales obtenidos mediante ensayos *in vivo* y en los fermentadores suministrando la dieta experimental HO.

Y, <i>in situ</i>	n	A	B	X, <i>in vitro</i>	r	RSD	SE
Concentración AGV totales mmol/l	05	-5,1655	2,07532	Concentración AGV totales mmol/l	0,90092	1,13774	*

n: número de repeticiones; r: coeficiente de correlación; RSD: desviación estándar residual; SE: significación estadística; *: $P < 0,05$.

En Tabla 46, se presentan las ecuaciones de correlación lineal establecida entre los valores de las concentraciones de AGV totales derivados de ensayos *in vivo* y en los

fermentadores, considerando todos los datos de las distintas dietas experimentales conjuntamente y, también ovino y caprino conjuntamente. La correlación es significativa ($P < 0,001$) y el coeficiente de correlación es positivo y elevado ($r = 0,771737$).

Tabla 46: Ecuación de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre los valores de concentración de AGV totales obtenidos mediante ensayos *in vivo* y en fermentadores suministrando las distintas dietas experimentales.

Y, <i>in situ</i>	n	A	B	X, <i>in vitro</i>	r	RSD	SE
Concentración AGV totales mmol/l	32	33,9482	0,350221	Concentración AGV totales mmol/l	0,771737	15,2301	***

n: número de repeticiones; r: coeficiente de correlación RSD: desviación estándar residual; SE: significación estadística; ***: $P < 0,001$.

Teniendo en cuenta esta ecuación y las concentraciones de AGV *in vivo*, se han estimado las producciones de AGV *in vivo* (Tabla 47). Las producciones de AGV totales estimadas *in vitro* son muy elevadas con la dieta HACOP y muy bajas con la dieta HO.

Tabla 47. Estimación de la producción de AGV totales *in vivo*, utilizando las producciones de AGV *in vitro*.

Dieta	Especie animal	AGV totales (mmol/día)
HA	Ovino	63,6
	Caprino	56,8
HACO	Ovino	77,8
	Caprino	68,1
HACOP	Ovino	89,5
	Caprino	93,3
HO	Ovino	25,7
	Caprino	27,9
HOSUP	Ovino	63,5
	Caprino	69,8

HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + cebada + habas.

4.5.4. Producción de nitrógeno bacteriano.

La ecuación de correlación lineal que aparece en la Tabla 48 indica que sólo existe una correlación significativa ($P < 0,001$) y positiva ($r = 0,74546$) entre la producción de nitrógeno bacteriano en los fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino y la obtenida *in vivo* con este especie animal, si se consideran todas las dietas experimentales.

Tabla 48. Ecuación de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre la producción de nitrógeno bacteriano obtenida en caprino y en los fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino, alimentados con las distintas dietas experimentales.

EA	Y, <i>in vivo</i>	n	A	B	X, <i>in vitro</i>	r	RSD	SE
Caprino	Producción NB g/día	16	2,99463	0,0056896	Producción NB mg/día	0,74546	1,33979	***

NB: nitrógeno bacteriano; n: número de repeticiones; r: coeficiente de correlación; RSD: desviación estándar residual; SE: significación estadística; ***: $P < 0,001$.

Puesto que no aparecen diferencias significativas entre la producción de nitrógeno bacteriano en ovino y caprino, se consideran los datos conjuntamente (Tabla 49). La ecuación de correlación, obtenida entre los valores de producción de nitrógeno bacteriano *in vitro* e *in vivo* es significativa ($P < 0,05$) y el coeficiente de correlación es positivo pero su valor es bajo ($r = 0,437343$).

Tabla 49. Ecuación de correlación ($Y = A + B \cdot X$) entre la producción de nitrógeno bacteriano obtenida mediante ensayos *in vivo* y en fermentadores suministrando las distintas dietas experimentales.

Y, <i>in vivo</i>	n	A	B	X, <i>in vitro</i>	r	RSD	SE
Producción NB g/día	32	4,84047	0,00411394	Producción NB mg/día	0,437343	2,18601	*

n: número de repeticiones; r: coeficiente de correlación; NB: nitrógeno bacteriano; RSD: desviación estándar residual; SE: significación estadística; *: $P < 0,05$.

4.6. VALORES DE AAT-PBV DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES.

Para el cálculo de la cantidad de aminoácidos absorbidos en el intestino delgado (AAT) y del balance proteico en el rumen (PBV) (Tabla 50) de las dietas ensayadas en este trabajo, se han utilizado los siguientes parámetros: contenido en PB de la dieta; degradabilidad efectiva de la proteína del alimento, obtenida *in situ* mediante la técnica de los sacos de nylon; digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en rumen, obtenida mediante la técnica de CALSAMIGLIA y STERN (1995), la proporción de aminoácido en la proteína bacteriano de los efluentes y la síntesis de proteína microbiana, estimada mediante la relación N-DAPA/N en los efluentes de los fermentadores. Para el resto de parámetros que intervienen en el cálculo de los valores de AAT y PBV se han utilizado los factores que existen en el Sistema Nórdico de Valoración Proteica para Rumiantes (MADSEN *et al.*, 1995): 0,85 para proporción de aminoácidos en la proteína dietética no degradada en rumen

para concentrados y de 0,65 para forrajes y, 0,85 para la digestibilidad de la proteína microbiana.

Las dietas basadas en heno de alfalfa (HA, HACO, HACOP) cubrieron las necesidades de mantenimiento en AAT de ovino y caprino en proporciones del 46 al 55% y del 67 a 78%, respectivamente. La hoja de olivo cubrió esas necesidades en proporciones del 34% y del 39%, respectivamente. La suplementación de esta dieta con habas y cebada permitió mejorar la situación llegándose a cubrir las necesidades referidas hasta en el 70 y 60%, respectivamente para ovino y caprino.

En cuanto al valor proteico del alimento para los microorganismos del rumen (PBV), las dietas basadas en HA atienden a las necesidades de los microorganismos ruminales e incluso en exceso. En cuanto a la dieta HO, los valores rozan el 0 e, incluso llegan a ser negativos. Sin embargo, la suplementación de hoja de olivo (dieta HOSUP) aumenta el balance proteico en el rumen de los animales.

Tabla 50. Valores medios de aminoácidos verdaderamente absorbidos en el intestino delgado (AAT) y del balance proteico en el rumen (PBV) que promueve la ingestión de las distintas dietas experimentales en ovino y caprino.

Dieta	EA	AAT				PBV		
		Aporte g/kg MS	Aporte g/d	Necesidades ¹ g/d	A/N	Aporte g/kg MS	Aporte g/d	Necesidades ² g/d
HA	Ovino	27,3	36,0	71,0	0,51	142	187	de -15 a -30
	Caprino	30,1	24,9	37,0	0,67	137	114	de -30 a 30
HACO	Ovino	27,5	32,5	71,0	0,46	111	132	de -15 a -30
	Caprino	36,8	28,1	35,8	0,78	95,3	72,6	de -30 a 30
HACOP	Ovino	26,9	35,1	64,0	0,55	112	146	de -15 a -30
	Caprino	36,8	30,2	40,0	0,76	95,6	78,4	de -30 a 30
HO	Ovino	24,1	22,9	67,5	0,34	6,98	6,61	de -15 a -30
	Caprino	30,9	16,8	43,3	0,39	-1,79	-0,97	de -30 a 30
HOSUP	Ovino	34,5	46,4	64,0	0,72	50,5	67,9	de -15 a -30
	Caprino	28,2	24,8	41,3	0,60	48,6	42,8	de -30 a 30

EA: especie animal; ¹ HAVREVOLL *et al.* (1992); INRA, (1989); ² CISZUK, (1992), HAVREVOLL *et al.* (1992); HA: heno de alfalfa; HACO: heno de alfalfa + concentrado; HACOP: heno de alfalfa + concentrado + PEG; HO: hoja de olivo; HOSUP: hoja de olivo + habas + cebada.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN.

5.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA.

El orujo extractado, desecado y parcialmente deshuesado (ODF) y la hoja de olivo de limpia procedente de almazara, son de carácter lignocelulósico su contenido en proteína bruta es bajo y, en su mayor parte está ligada a la fracción lignocelulósica (47,0 y 45,0 g N-FAD/100 g de nitrógeno total para ODF y hoja de olivo, respectivamente). Los componentes fibrosos del orujo de dos fases son muy superiores a los de la hoja de olivo (FND 63,2 y 39,9 g/100 g MS; FAD 43,0 y 25,5 g/100 g MS; LAD 23,6 y 14,1 g/100 g MS, respectivamente).

La información, acerca de la composición química de esos subproductos, es escasa sobre todo en el caso del ODF. La información disponible se ha generado a partir de trabajos realizados desde 1997 (MARTÍN GARCÍA, 2001; MARTÍN GARCÍA et al., 2003; YÁÑEZ RUIZ, 2003).

El contenido en materia seca del orujo utilizado en este trabajo es del mismo orden que la encontrada por MOLINA y AGUILERA (1991) y por MARTÍN GARCÍA (2001) con el orujo de tres fases, tamizado y parcialmente deshuesado y con orujo de dos fases extractado y deshuesado, respectivamente.

El contenido en materia orgánica, encontrado en este trabajo, es del mismo orden que el encontrado por Martín García (2001) y YÁÑEZ RUIZ (2003), utilizando orujo de dos fases extractado y parcialmente deshuesado.

El contenido en componentes fibrosos del orujo de dos fases es muy elevado y del mismo orden que el observado por YÁÑEZ RUIZ (2003). MARTÍN GARCÍA (2001) encontró valores similares para la FND, pero los valores de la FAD y LAD eran más elevados que los que se han encontrado en este trabajo lo que indica una gran variabilidad en la composición de este subproducto en cuanto a los componentes lignocelulósicos y, con toda probabilidad, se asocia al grado de deshuesado al que el material se haya sometido.

El contenido en energía bruta, obtenido en este trabajo, está dentro del rango obtenido en una revisión bibliográfica llevada a cabo por MOLINA ALCAIDE y NEFZAOU (1996) con distintos orujos de tres fases. El ODF presenta un contenido en energía bruta del mismo orden que el que obtuvieron MARTÍN GARCÍA (2001) y YÁÑEZ RUIZ (2003), utilizando el mismo tipo de subproducto.

El contenido en nitrógeno total del ODF, encontrado en este trabajo, es superior al valor obtenido por MARTÍN GARCÍA (2001) con orujo de dos fases, extractado y desecado. Sin embargo, MOLINA ALCAIDE y AGUILERA (1991) y AGUILERA *et al.* (1992) encontraron valores de nitrógeno total de los orujos de “tres fases”, extractados y tamizados superiores a los que se han encontrado en este trabajo. El porcentaje de nitrógeno ligado a las paredes celulares (N-FAD) es del mismo orden que el encontrado por YÁÑEZ RUIZ (2003) para el orujo de dos fases. Sin embargo, MARTÍN GARCÍA (2001) encontró valores más elevados de N-FAD con el orujo de dos fases extractado y desecado. Las reacciones de “Maillard”, favorecidas por la elevada temperatura y la humedad que se producen durante la extracción del aceite y la desecación de orujo, serían en gran parte responsables del deterioro de la calidad de la proteína y de su disponibilidad. Los factores no nutritivos, como los taninos precipitan las proteínas (MCMANUS *et al.*, 1981) y las hacen insolubles (THERIEZ y BOULE, 1970) y, por tanto, podrían explicar también, en parte, el elevado aunque variable contenido en nitrógeno asociado a la pared celular de estos subproductos.

La información bibliográfica existente acerca del contenido en taninos condensados totales del orujo es escasa (MARTÍN GARCÍA, 2001; MARTÍN GARCÍA *et al.*, 2003; YÁÑEZ RUIZ, 2003). Los taninos condensados totales encontrados en los ODF son del mismo orden que los encontrados por YÁÑEZ RUIZ (2003) utilizando la misma técnica de extracción y cuantificación y el mismo tipo de orujo de dos fases. MARTÍN GARCÍA (2001), utilizó técnicas analíticas distintas y encontró valores de los TCT inferiores a los encontrados en este trabajo. La heterogeneidad en los resultados podría ser explicada por la procedencia de la aceituna, de la campaña de recogida, y las distintas técnicas analíticas, entre otros factores.

No existe información en la bibliografía sobre el contenido en bases púricas totales en el orujo de dos fases. Sin embargo, el contenido es muy parecido al encontrado en otros subproductos como el bagazo de cervecería (PÉREZ *et al.*, 1996b): 5,04 y 4,57 $\mu\text{mol/g MS}$ para ODF y bagazo de la industria cervecera, respectivamente.

La información relativa a la composición química de la hoja de olivo ha sido discutida profundamente en otras memorias de tesis doctorales realizadas recientemente en nuestro grupo (MARTÍN GARCÍA, 2001; YÁÑEZ RUIZ, 2003) por lo que solo se refieren en este trabajo aquellos aspectos de especial relevancia.

El contenido energético encontrado para la hoja de limpia es superior al observado por MARTÍN GARCÍA (2001): 21,1 frente 16,8 MJ EB/kg MS. El contenido en extracto etéreo es

del mismo orden que el encontrado por YÁÑEZ RUIZ (2003), próximo al 8% de la MS y, muy probablemente, debido a la mezcla de la hoja con aceituna.

Los valores, tanto de PB como de N-FAD, encontrados en el presente trabajo son del mismo orden que los obtenidos por YÁÑEZ RUIZ (2003) mientras que se observan diferencias con los resultados descritos por MARTÍN GARCÍA (2001). Así, la PB es superior al valor encontrado por este último autor en hoja desecada a 60 °C mientras que el valor de N-FAD que este autor encontró era muy superior al obtenido en nuestro trabajo. Ello indica la probable generación de compuestos de "Maillard" como consecuencia de la desecación de las hojas. El mismo fenómeno descrito para los componentes nitrogenados parece ocurrir con los componentes de las paredes celulares, cuyos contenidos son muy semejantes en la hoja empleada en este trabajo y en el de YÁÑEZ RUIZ (2003) pero inferiores a los obtenidos por MARTÍN GARCÍA (2001) en hoja desecada. Las diferencias entre los resultados de estos trabajos se pueden deber al distinto origen del subproducto empleado.

Estos resultados hacen pensar que el grado de concentración de los componentes estructurales está influenciado por las condiciones de manipulación y desecación del material (GÓMEZ CABRERA *et al.*, 1992; DELGADO PERTÍÑEZ *et al.*, 1994, 1998), por el contenido en leño de las hojas (ALIBÉS *et al.*, 1982; GÓMEZ CABRERA *et al.*, 1982; DELGADO-PERTÍÑEZ, 1994; DELGADO-PERTÍÑEZ *et al.*, 2000) y por el contenido en taninos (ROBERTSON y VAN SOEST, 1981).

La comparación de los resultados, relativos a los compuestos fenólicos obtenidos por los distintos autores, está limitada por los métodos analíticos empleados por cada autor y por las condiciones de manipulación del material utilizado. Los valores en TCT de la hoja, encontrados en este trabajo son del mismo orden que los obtenidos por YÁÑEZ RUIZ (2003) que encontró un valor de 11,1 mg/g MS.

En relación a la composición aminoacídica de la hoja de olivo, las referencias bibliográficas son muy escasas (MARTÍN GARCÍA, 2001; YÁÑEZ RUIZ, 2003). MARTÍN GARCÍA (2001) encontró valores en aminoácidos totales en hoja de olivo desecada a 60°C superiores a los obtenidos en el presente trabajo. El contenido en aminoácidos no esenciales es del mismo orden que los encontrados por MARTÍN GARCÍA (2001) (31,5 g/kg MS). Si comparamos los valores en aminoácidos individuales encontrados por MARTÍN GARCÍA (2001) para hoja de olivo desecada a 60°C y los obtenidos en este trabajo, observamos que los aminoácidos aspártico, glutámico, histidina, arginina, tirosina y isoleucina presentan valores inferiores en el trabajo de MARTÍN GARCÍA (2001).

En la bibliografía consultada, tampoco existe información sobre la composición en bases púricas de la hoja de olivo. Sin embargo, se observa que el contenido en bases púricas de la hoja de olivo es muy superior a la encontrada en heno de alfalfa y en paja de cebada por ZELAYA (1994) y por MARTÍN-ORÚE *et al.* (1998), respectivamente. Nuestros valores son del mismo orden que los encontrados en harina de carne por PÉREZ *et al.* (1996) y, probablemente, indican una contaminación microbiana.

Por lo que se refiere a otros ingredientes de las dietas ensayadas, los contenidos en componentes de las paredes celulares de la cebada, encontrados en este trabajo son del mismo orden que los encontrados por AGUILERA y PRIETO (1991). El contenido en TCT de las habas es del mismo orden que el encontrado por CABRERA y MARTÍN (1986) para diversas variedades de habas.

La cebada contiene una cantidad de TCT del orden de 10,7 mg/g MS y la mayoría de estos TCT están en forma libre siendo estos valores superiores a los encontrados por BEN SALEM *et al.* (1999a).

El contenido en bases púricas totales de la cebada es del mismo orden que el que encontró PÉREZ *et al.* (1996b) en este material. El contenido en púricas de las habas es comparable a los valores encontrados por PÉREZ *et al.* (1996b) para el "gluten feed".

La composición química del heno de alfalfa utilizado en este trabajo es del mismo orden que la descrita por AGUILERA *et al.* (1992), ANDRADE *et al.* (1996) y MOLINA ALCAIDE *et al.* (2000) para este forraje. Su contenido en TCT es del orden de 4,90 mg/g MS. NUÑEZ-HERNANDEZ *et al.* (1989) encontraron valores de taninos en el heno de alfalfa que oscilan entre 3 y 7 mg de catequina equivalente/g MS. El contenido en bases púricas totales es del mismo orden que el que ha encontrado PÉREZ *et al.* (1996b).

5.2. DIGESTIBILIDAD INTESTINAL DE LA PROTEÍNA NO DEGRADADA EN EL RUMEN.

La aplicación de los Nuevos Sistemas de Valoración Proteica de Alimentos para Rumiantes requiere una amplia información sobre la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen, de recursos de naturaleza variada. Pese al hecho de que los forrajes forman una gran parte de la dieta de los rumiantes, existe muy poca información sobre la digestibilidad intestinal de su proteína no degradada en el rumen.

La mayoría de los sistemas de valoración proteica asumen que la digestibilidad intestinal de la proteína dietética no degradada en el rumen (DIPNDR) es constante. El sistema

AAT/PBV le asigna un valor de 0,82. El ARC (1984) propone un valor constante de 0,85, pero resulta imprescindible generar una información más amplia, relativa a los alimentos forrajeros y, sobre todo, de los no convencionales.

En este trabajo se ha utilizado la técnica propuesta por CALSAMIGLIA y STERN (1995) para determinar la digestibilidad intestinal de la proteína. Se trata de una combinación de etapas *in situ* e *in vitro*. Esta técnica implica una preincubación ruminal de 16 horas aunque también en este trabajo, algunos alimentos se han incubado durante 48 horas, ya que algunos autores (HVELPLUND *et al.*, 1992; MGHENI *et al.* 1994; VANHATALO *et al.* 1996; PREIRA *et al.*, 1998) indican que, para los alimentos forrajeros, 16 horas de preincubación podrían no ser suficientes para su adecuada valoración.

La DIPNDR del orujo de dos fases está comprendida entre 35,3 y 42,1, y entre 41,6 y 48,0 para preincubaciones realizadas durante 16 horas y 48 horas, respectivamente. Los valores correspondientes a la hoja de olivo son de 34,5 a 53,1 y de 53,3 a 58,9. MARTÍN GARCÍA (2001), utilizando la misma técnica, encontró valores de la DIPNDR para orujo de dos fases y hoja de olivo desecada a 60°C de 36,9 y 42%, respectivamente tras 16 horas de preincubación ruminal. Como se observa, la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en rumen no varía cuando se utilizan las mismas condiciones experimentales a pesar de que los subproductos incubados en ambos trabajos (orujo y hoja) presentan una composición variable.

La DIPNDR no se ve afectada por el calentamiento de la hoja de olivo. PREIRA *et al.* (1998) observaron que el calentamiento de subproductos de la cebada a 50°C o 100°C, no afectaba ni al contenido en NIDA ni a la digestibilidad intestinal del N y sugirieron que temperaturas inferiores a 100°C no tienen un efecto importante sobre la disponibilidad del nitrógeno. Sin embargo, la digestibilidad total de la proteína (DTPB) aumenta en la hoja de olivo cuando esta se calienta a 60°C, en comparación con lo que ocurre cuando esta hoja se deseca a temperatura ambiente. La mejora podría deberse a un aumento en la degradación ruminal, lo que hace pensar que este subproducto contiene compuestos fenólicos que limitan la disponibilidad de la proteína a nivel ruminal y que serían inhibidos por el calor. Estos resultados se ven confirmados con el aumento de la degradabilidad ruminal, como consecuencia del calentamiento de la hoja. El aumento en la DTPB de las muestras calentadas concuerda con los resultados observados por CALSAMIGLIA y STERN (1995), quienes obtuvieron también un aumento en la digestibilidad de la proteína de diferentes alimentos sometidos a distintas temperaturas de calentamiento. PREIRA *et al.* (1998)

observaron también un aumento en el suministro de nitrógeno dietético no degradado y digestible al duodeno con subproductos de la cebada, calentados a diferentes temperaturas.

La prolongación del tiempo de preincubación ruminal de las muestras de 16 a 48 horas mejora la disponibilidad total de la proteína. La DRPB y la DIPNDR de los alimentos aumentan, a excepción de la DIPNDR del orujo de la campaña 1999. KATHO *et al.* (1998), utilizando la técnica de los sacos móviles, obtuvieron un aumento en la DIPNDR de 18 leguminosas forrajeras de las 40 ensayadas, al prolongar el tiempo de incubación de 16 a 24 horas. Sin embargo, PEREIRA *et al.* (1998) observaron una disminución de la digestibilidad intestinal al prolongar el tiempo de incubación en el rumen. Estos autores sugirieron que cada alimento contiene una fracción nitrogenada, que no se degrada ni en el rumen ni en el intestino, y que provoca una disminución de la digestibilidad intestinal al prolongarse el tiempo de incubación en el rumen. La prolongación de la incubación en el rumen aumenta la concentración de la fracción del nitrógeno que no se degrada ni se digiere. Y que, por ello en los alimentos de naturaleza lignocelulósica, la digestibilidad intestinal está determinada, en gran medida, por el tiempo de incubación en el rumen.

El tratamiento con PEG del concentrado utilizado en el presente trabajo no parece tener efecto sobre la disponibilidad intestinal de la proteína de este alimento. Estos resultados podrían ser explicados con el bajo contenido en taninos de dicho concentrado o por una dilución rápida del PEG en el rumen del animal.

La hoja de olivo, tratada o no con calor, muestra una mayor disponibilidad del nitrógeno a niveles ruminal e intestinal cuando se incubaba durante 16 horas en el rumen de caprino que en el de ovino. Esta mayor disponibilidad en caprino fue observada también por MARTÍN GARCÍA (2001). Al prolongar el tiempo de preincubación ruminal a 48 horas, el efecto de la especie animal en que se realiza la preincubación desaparece e, incluso, la DIPNDR y la DTPB llegan a ser muy similares para muestras incubadas en rumen de ovino y caprino.

5.3. DEGRADABILIDAD DE LA PROTEÍNA EN LOS FERMENTADORES.

La determinación de la degradabilidad ruminal *in situ*, con animales fistulados en el rumen, es laboriosa y costosa, y no puede considerarse como método de rutina para la evaluación proteica de un elevado número de alimentos. Por ello, resulta de vital importancia desarrollar un método alternativo y, en este sentido, el uso de fermentadores se presenta como prometedor.

En el presente trabajo, la degradabilidad ruminal de la proteína de los distintos ingredientes utilizados en la elaboración de las dietas experimentales así como de las

propias dietas, se ha determinado incubando las muestras, contenidas en sacos de nylon, en los vasos de fermentación de los fermentadores de flujo continuo, inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino.

Las dietas que se suministraban a los fermentadores eran las mismas que consumían los animales (ovino y caprino) donadores de los inóculos empleados en los fermentadores. Los valores de degradabilidad efectiva se han estimado mediante la ecuación de ØRSKOV y MCDONALD (1979) aplicando, para la velocidad de paso K (h^{-1}), el valor de flujo de salida de la saliva artificial en cada fermentador.

La degradabilidad potencial (DP, %) de la proteína del heno de alfalfa incubado en los fermentadores de flujo continuo cuando estos eran alimentados con el mismo heno de alfalfa, es del mismo orden que la encontrada por YÁÑEZ RUIZ (2003) *in situ*, con animales alimentados con heno de alfalfa a nivel de mantenimiento. La degradabilidad efectiva (DE, %) de la proteína del heno de alfalfa era de 74,2 y 74,7 % en fermentadores inoculados con líquido ruminal de ovino y caprino, respectivamente. Estos valores son del mismo orden que los encontrados por MOLINA ALCAIDE *et al.* (2000) *in situ*, con animales alimentados con heno de alfalfa a nivel de mantenimiento. Sin embargo, YÁÑEZ RUIZ (2003) encontró valores de DE superiores a los encontrados en este trabajo (82,7 y 84,4% en ovino y caprino, respectivamente). Los valores de b encontrados por YÁÑEZ RUIZ (2003), *in situ*, son superiores a los obtenidos en el presente trabajo (30,6 y 49,8% *in vitro* e *in situ*, respectivamente). No obstante, los valores de a son superiores en los fermentadores (59,9 y 39,5% en fermentadores y en animales, respectivamente). Los valores de c de la PB, encontrados *in situ* por MOLINA ALCAIDE *et al.* (2000) y por YÁÑEZ RUIZ (2003), son más elevados que los encontrados en este trabajo (0,039 y 0,120 /h *in vitro* e *in situ*, respectivamente). BLANCHART *et al.* (1989) compararon la cinética de degradación del nitrógeno de 11 alimentos determinada en "RUSITEC" e *in situ*, y observaron que la degradación era superior *in vivo* que *in vitro*, para periodos intermedios (4 a 24 horas). Estos autores asociaron esas diferencias a la distinta actividad microbiana que tiene lugar en el animal y en el frasco de fermentación. En los sistemas *in vitro*, el suministro de alimento una vez ó 2 veces al día no favorece la continuidad en la fermentación, mientras que *in vivo*, el animal puede tomar el alimento más frecuentemente y así activar la capacidad fermentativa de sus microorganismos ruminales.

La degradabilidad del heno de alfalfa cuando los fermentadores recibían la dieta HACO es muy similar a los valores encontrados cuando los fermentadores recibían heno de alfalfa

sólo. Estos valores están en concordancia con los valores encontrados *in situ* en nuestro laboratorio (YÁÑEZ RUIZ, 2003).

Las diferencias encontradas entre los valores obtenidos *in situ* y en los fermentadores de flujo continuo pueden deberse a: i) la ausencia de protozoos en los fermentadores, microorganismos que representan un tercio de la biomasa microbiana del rumen y que facilitan la degradación de los nutrientes por las bacterias. BONHOMME (1990) ha observado que los pequeños protozoos entodiniomorfos son celulolíticos; ii) al volumen del microambiente que rodea al saco en el fermentador, menor que cuando la incubación se realiza en el animal.

Los valores de la DE de la proteína del concentrado (CO), encontrados en este trabajo, son inferiores en casi 10 unidades porcentuales a los valores encontrados por YÁÑEZ RUIZ (2003) *in situ*. Los valores de *a* son del mismo orden que los obtenidos *in situ* por YÁÑEZ RUIZ (2003) y los de *b* y *c* inferiores a los encontrados por este autor. Los valores de degradabilidad de la dieta HACO reflejan los valores determinados para sus ingredientes.

La adición de PEG a los fermentadores cuando recibían la dieta HACO tuvo un cierto efecto sobre la degradabilidad de la proteína *in vitro* del CO y de la dieta HACO, disminuyendo los valores de *a* y aumentando los valores de *b*, aunque los valores de DE y DP no mejoraron. La adición de PEG aumentó considerablemente la velocidad de degradación *c* de la fracción *b* del CO y de la dieta HACO. Los valores de *c* de la proteína del CO eran de 0,065 *vs* 0,054 y 0,079 *vs* 0,045 para fermentadores que recibían PEG *vs* que no recibían PEG e inoculados con líquido ruminal de ovino y caprino, respectivamente. Los valores de *c* de la fracción *b* de la dieta HACO eran de 0,088 *vs* 0,052 y 0,059 *vs* 0,050 para fermentadores que recibían PEG *vs* que no recibían PEG e inoculados con líquido ruminal de ovino y caprino, respectivamente. El efecto que tiene el PEG sobre los parámetros de la degradabilidad del CO y del HACO, en los fermentadores de flujo continuo, observado en este trabajo, fue también observado *in vivo* en nuestro laboratorio por YÁÑEZ RUIZ (2003).

El efecto que tiene el PEG sobre la fracción *a* y *b* de la degradabilidad de los alimentos en este trabajo, fue también observado por BEN SALEM *et al.* (1999b) con ovejas que consumían *Acacia cyanophylla*. AHARONI *et al.* (1998) indicaron que el efecto de presencia de taninos condensados sobre la degradabilidad de la proteína se debía a un menor ritmo de degradación ruminal. Aún así, no hubo una mejora significativa en la DE de los valores obtenidos en este trabajo. Sin embargo, BABA *et al.* (2002) si observaron un efecto significativo derivado de la adición de PEG sobre la degradabilidad de los arbustos. El

hecho de que no haya una mejora significativa de la DE, en este trabajo, podría deberse a diversos factores: i) el bajo contenido en taninos condensados del concentrado, ya que éste está constituido por un 1/3 de orujo (que sólo aporta cantidades significativas de taninos condensados) y 2/3 de cebada (que aporta cantidades insignificantes de TCT); ii) un cierto grado de adaptación de los microorganismos ruminales a los taninos; bien a través de un aumento de las cepas resistentes a estos polifenoles (NELSON *et al.*, 1998; RAMOS *et al.*, 1999) o de la actividad de las enzimas celulolíticas intracelulares (BAE *et al.*, 1993). En este sentido, CHIQUETE *et al.* (1988) observaron modificaciones morfológicas de los microorganismos ruminales en presencia de proantocianidinas; iii) la degradación de los taninos por los microorganismos ruminales. En este sentido, SKENE y BROOKER (1995) han identificado una cepa de la bacteria *Selenomonas ruminantium* subsp. *ruminantium*, provista de enzimas con actividad tanino-acilhidrolasa y, por ello, capaz de crecer en presencia de ácido tánico o taninos condensados, como única fuente de energía (SKENE y BROOKER, 1995); iv) la presencia en esas dietas de proteína degradable suficiente para que los microorganismos ruminales no se van afectados por la presencia de taninos condensados.

La información bibliográfica disponible que aporta datos de degradabilidad de la hoja de olivo obtenidos en sistemas *in vitro* es nula. Las únicas referencias que existen, sobre la degradabilidad de este alimento, han sido obtenidos recientemente en nuestro departamento por MARTÍN GARCÍA (2001) y YÁÑEZ RUIZ (2003), *in situ*. Precisamente este último autor ha utilizado las mismas condiciones de incubación ruminal que las ensayadas en el presente trabajo. Los valores de la fracción *a* de la degradabilidad de la PB de hoja de olivo son superiores a los encontrados por MARTÍN GARCÍA (2001) y por YÁÑEZ RUIZ (2003), *in situ*. No obstante, los valores de *b* son inferiores a los encontrados por este último autor, *in situ*. El ritmo de degradación (*c*) era del mismo orden que los valores encontrados, *in situ* por MARTÍN GARCÍA (2001) e inferiores a los valores encontrados por YÁÑEZ RUIZ (2003). La DP de la PB de hoja de olivo, encontrada en el presente trabajo, era del mismo orden que la encontrada *in situ* por YÁÑEZ RUIZ (2003). La DE era ligeramente superior a la encontrada *in situ* por este último autor. Este hecho podría atribuirse a: i) la naturaleza física de la hoja de olivo ya que los alimentos fibrosos y pobres en nitrógeno son más susceptibles a una contaminación microbiana que los concentrados (VARVIKKO y LINDBERG, 1985); ii) al microambiente ruminal que rodea el saco en el fermentador, que es de menor tamaño que cuando la muestra se incubaba en el rumen del animal, ya que en este último caso, la densidad bacteriana es superior y, por tanto, las posibilidades de que se produzca una contaminación bacteriana también es mayor. En este sentido, NEGI *et al.*

(1988) observaron que la contaminación bacteriana del material residual no degradado podría ser una fuente de error muy importante; iii) la cantidad de muestra incubada en el fermentador (1,2 g) es de menor tamaño que *in situ* (3,5 g). Aunque varios autores (MICHALET-DOREAU y OULD-BAH, 1992; HVELPLUND y WEISBJERG, 2000) han demostrado la eficacia del “golpeteo mecánico” para desligar las bacterias adheridas a las partículas, otros (MARTÍN-ORÚE *et al.*, 1998) han observado que este método no consigue eliminar completamente la contaminación microbiana de la muestra incubada.

La degradabilidad ruminal, *in situ*, obtenida para la hoja de olivo por MARTÍN GARCÍA (2001) fue superior de 13 unidades porcentuales a la obtenida en los fermentadores de flujo continuo. Esto podría deberse a distintas razones: i) la distinta calidad de la dieta que consumían los animales y de la que recibían los fermentadores. Los animales recibían dietas a base de heno de alfalfa, a nivel de mantenimiento, que cubría las necesidades de los microorganismos ruminales (AGUILERA *et al.*, 1992) mientras que los fermentadores recibían hoja de olivo que presenta deficiencias en proteína y hidratos de carbono y, por tanto, no satisface los requerimientos de los microorganismos ruminales; ii) las diferencias en la composición química y el manejo de las hojas utilizadas en ambos trabajos.

La velocidad de degradación de la PB de la hoja de olivo era superior en los fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino que en los inoculados con líquido ruminal de ovino. Estas observaciones coinciden con las realizadas por GARCÍA *et al.* (1995), *in situ*, con alimentos altamente lignificados.

Los valores de DE de la PB de la cebada y de las habas, encontrados por YÁÑEZ RUIZ (2003) *in situ*, eran superiores (de 17 y 6 unidades porcentuales para la cebada y las habas, respectivamente) a las encontradas en los fermentadores. Estas diferencias podrían deberse a las mismas razones mencionadas para el caso del heno de alfalfa: ausencia de protozoos en los fermentadores, o el volumen del microambiente que rodea al saco en el fermentador y en el rumen.

5.4. TÉCNICAS DE SIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD RUMINAL: FERMENTADORES DE FLUJO CONTINUO.

5.4.1. Características de los inóculos ruminales utilizados en los fermentadores.

El líquido ruminal, utilizado como inóculo de los fermentadores, se extrajo de ovino de raza *segureña* y de caprino de raza *granadina*. Los animales se alimentaban con las mismas dietas experimentales ensayadas en los fermentadores.

Los valores de pH encontrados en los inóculos ruminales utilizados para la inoculación de los fermentadores están, en general, dentro del rango de los valores considerados como óptimos para que se produzca una actividad celulolítica (STEWART, 1977; MOULD *et al.*, 1983). Incluso, en el caso de los animales alimentados con las dietas HACO y HACOP, los valores de sus contenidos ruminales se sitúan por debajo del límite considerado como mínimo para que se produzca una actividad celulolítica óptima. Esto podría explicarse en base a dos razones, fundamentalmente: i) el tiempo transcurrido entre la obtención del líquido ruminal y su inoculación en los fermentadores, ya que en este periodo se siguen produciendo AGV y no en presencia tampón; ii) después de 2 horas del suministro de la dieta a los animales es posible que estos hayan consumido únicamente el concentrado y no el forraje y, por tanto, se fermentan solo carbohidratos fácilmente degradables lo que hace bajar el pH ruminal. En base a los valores obtenidos por YÁÑEZ RUIZ (2003) en el líquido ruminal obtenido a las dos horas tras el suministro de alimento, en animales alimentados con la misma dieta, que oscilaron entre 6,03 y 7,18 parece que sería la primera razón la que explicaría los valores observados en el presente trabajo.

En general, las concentraciones de nitrógeno amoniacal en el líquido ruminal de los animales están dentro del rango de valores obtenidos por YÁÑEZ RUIZ (2003) también en animales, a las 2 horas del suministro de las mismas dietas que las ensayadas en este trabajo. Para la dieta HA los valores encontrados en el presente trabajo son superiores, de 40 unidades porcentuales, a los obtenidos por MOLINA ALCAIDE *et al.* (2000), en animales alimentados con heno de alfalfa. Para la dieta HO, la concentración de N-NH₃ es muy baja e incluso llega a ser inferior a los valores considerados como óptimos para un crecimiento microbiano adecuado en el rumen (2 mg/100 ml, SATTER y SLYTER, 1974).

Las concentraciones de AGV totales de los inóculos ruminales empleados en este trabajo son del mismo orden que los valores obtenidos por YÁÑEZ RUIZ (2003), con animales que tomaban las mismas dietas. Los valores de AGV totales encontrados cuando los animales consumían heno de alfalfa, son semejantes a los encontrados por ANTONIOU y HADJIPANAYIOTOU (1985) y por MOLINA ALCAIDE *et al.* (2000) con animales alimentados con este mismo material. Al sustituirse una parte del heno de alfalfa por el concentrado aumentan las concentraciones de los AGV totales en el contenido ruminal de los animales lo que concuerda con lo observado por SRINIVAS y GUPTA (1997), al suplementar paja de cereales con un concentrado. La proporción de ácido acético sigue siendo alta (69% de los AGV totales) cuando se realiza esa sustitución, lo que indicaría una fermentación celulolítica predominante (SUDANA y LENG, 1986; SRINIVAS y GUPTA, 1997). Las

proporciones molares de los ácidos propiónico y butírico aumentan. El incremento en la proporción molar de propionato con la sustitución de una parte de heno de alfalfa por el concentrado, indica una mejora en la utilización de la energía (VAN HOUTERT, 1993) que proviene de los carbohidratos solubles de la cebada. El aumento en la proporción molar de butirato coincide con lo observado por ANTONIOU y HADJIPANAYIOTOU (1985), al suplementar heno de alfalfa con un concentrado y por GIGER *et al.* (1988), en cabras, al suplementar heno de alfalfa con granos de cereales. Los valores de AGV totales también aumentan al suplementar la dieta HO con una fuente de energía y proteína (dieta HOSUP).

5.4.2. Características de las dietas experimentales administradas a los fermentadores.

Las cantidades de materia seca suministrada a los fermentadores diariamente oscilaron entre 38,0 y 62,8 g por fermentador y día, que corresponden a las dietas HOSUP y HACOP, respectivamente. Una extensa revisión bibliográfica realizada (CZERKAWSKI y BRECKENRIDGE, 1969; SATTER y SLYTER, 1974; WELLER y PILGRIM, 1974; STERN *et al.*, 1978; BAS *et al.*, 1990; CHESTER-JONES *et al.*, 1991; MANSFIELD *et al.*, 1994; CARRO *et al.*, 1995; CALSAMIGLIA *et al.*, 1996; KARUNANANDAA y VARGA, 1996; MOLINA ALCAIDE *et al.*, 1996; CARRO y MILLER, 1999b; MARTÍN GARCÍA, 2001) indica que la cantidad de dieta suministrada a los fermentadores por los distintos autores ha sido muy variada (6,99- 100 g MS por fermentador y día), aunque frecuentemente se han suministrado 75 g por fermentador y día (BLAKE y STERN, 1988; CHESTER-JONES *et al.*, 1990; HUSSEIN *et al.*, 1991; MANSFIELD *et al.*, 1994; CALSAMIGLIA *et al.*, 1999). La forma en que se administra el alimento es, también, muy variada: desde una vez al día (CARRO *et al.*, 1995; BROUDISCOU *et al.*, 1997) al suministro continuo (CRAWFORD *et al.*, 1980; TEATHER y SAUER, 1988; CHESTER-JONES *et al.*, 1990; MERRY *et al.* 1990; MANSFIELD *et al.*, 1995; CALSAMIGLIA *et al.*, 1999). También el tipo de dieta suministrada a los fermentadores es muy variable: desde una dieta altamente fibrosa (BAS *et al.*, 1990; MOLINA ALCAIDE *et al.*, 1996; MARTÍN GARCÍA, 2001) a un concentrado (STERN *et al.*, 1978; STOKES *et al.*, 1991a; CALSAMIGLIA *et al.*, 1996).

Por todo ello, resulta muy difícil comparar los resultados obtenidos y ha de asumirse la imposibilidad de realizar un estudio comparativo, entre las cantidades de proteína y de carbohidratos suministrados y las de los productos resultantes de la fermentación. Una alternativa podría ser la comparación de las eficiencias de síntesis de la proteína microbiana y de la producción de los AGV. Sin embargo, resulta también muy difícil comparar estos

parámetros ya que cada autor utiliza metodologías diferentes e, incluso, expresiones referidas a parámetros energéticos muy distintos.

La cantidad de nitrógeno administrado diariamente a los fermentadores oscila entre 0,50 y 1,43 g/fermentador/día que correspondían a la dieta HO y HACOP, respectivamente. Estas cantidades fueron inferiores a las referidas por otros autores (CHESTER-JONES *et al.*, 1990; MANSFIELD *et al.*, 1995) y superiores a las proporcionadas por CARRO y MILLER (1999b). Sin embargo, las cantidades de nitrógeno suministradas a los fermentadores alimentados con heno de alfalfa son del mismo orden que las referidas por CARRO *et al.* (1995): 1,34 frente a 1,32 g N/día. MERRY *et al.* (1990) proporcionaron cantidades de nitrógeno superiores a las suministradas en este trabajo a los fermentadores que se alimentan con las dietas a base de hoja de olivo.

El nitrógeno ligado a la fibra ácido detergente representa aproximadamente, el 9% del nitrógeno total suministrado, para las dietas a base de heno de alfalfa y el 35% en las dietas formuladas a base de hoja de olivo. MARTÍN GARCÍA (2001) encontró valores de nitrógeno asociado a la fracción lignocelulósica que oscilaron entre 33 y 71% y entre 36 y 53%, con dietas a base de orujo de dos fases y hoja de olivo, respectivamente.

El suministro diario de nitrógeno aminoacídico variaba entre 1587 y 1066 mg N-aa/fermentador y, entre 334 y 449 mg N-aa/fermentador con dietas base de heno de alfalfa y hoja de olivo, respectivamente. Los valores referidos a este respecto que existen en la bibliográfica son muy distintos. Ello podría deberse a diferencias en la cantidad de materia seca administrada, a la forma de expresión de los contenidos de estos aminoácidos o al tipo de la dieta que se administra. CALSAMIGLIA *et al.* (1995) refiere valores de 10,8 a 13,0 g/fermentador/día, con 8 dietas distintas. MARTÍN GARCÍA (2001), suministraba cantidades que oscilaban entre 196 y 224 mg N-aa/fermentador/día, con dietas a base de orujo y entre 199 y 214 mg N-aa por fermentador y día, con aquellas a base de hoja de olivo. En relación a la administración de metionina y lisina, en el presente trabajo las cantidades variaban entre 1,89 y 8,73 mg de metionina por fermentador y día y, entre 16,6 y 141 mg de lisina/fermentador/día. MARTÍN GARCÍA (2001) proporcionó valores que variaban entre 3,64 y 4,36 mg de metionina/fermentador/día, para dietas basadas en orujo y entre 4,16 y 4,56 mg de metionina/fermentador/día con dietas basadas en hoja de olivo. Estos valores son superiores a los de nuestros ensayos, con dietas a base de hoja de olivo, e inferiores a los valores suministrados con dietas a base de heno de alfalfa. En relación al suministro de lisina, MARTÍN GARCÍA (2001) obtuvo valores inferiores a los suministrados en el presente trabajo.

La cantidad de nitrógeno en forma bases púricas que se suministró diariamente a los fermentadores variaba entre 35,0 y 93,7 mg N-BP/fermentador/día, con dietas HOSUP y HA, respectivamente. En la bibliografía, no hay fuentes disponibles que permiten comparar los valores encontrados en este trabajo con los de otros autores.

El suministro de carbohidratos totales osciló entre 28,4 y 46,6 g/fermentador/día para las dietas HOSUP y HACOP, respectivamente. La proporción de carbohidratos estructurales fue del orden de 47 a 57% de los carbohidratos totales suministrados. Las cantidades de CHO totales, suministrados diariamente a cada fermentador son superiores a los valores utilizados por MERRY *et al.* (1990). MARTÍN GARCÍA (2001) utilizó el mismo sistema de flujo continuo y suministraba cantidades que oscilaban entre 20,5 y 13,5 y entre, 19,9 y 14,3 de CHO totales/fermentador/día con dietas a base de orujo y hoja de olivo, respectivamente. Estas cantidades eran inferiores a las suministradas en el presente trabajo.

En los ensayos que incluye este trabajo se han suministrado cantidades de taninos condensados totales que oscilaban entre 443 y 473 mg de TCT/fermentador/día, para dietas a base de hoja de olivo y, entre 368 y 225 mg de TCT por fermentador y día, para dietas a base de heno de alfalfa. La única fuente bibliográfica en la que se refiere al suministro de TCT a los fermentadores corresponde al trabajo de MARTÍN GARCÍA (2001) que suministraba diariamente entre 240 y 260 mg de TCT por fermentador, con orujo de dos fases y, entre 160 y 171 mg de TCT/fermentador/día con hoja de olivo.

Puesto que en los últimos años, los estudios realizados con sistemas de flujo continuo han sido objeto de un gran interés como alternativa a los ensayos *in vivo* con rumiantes, es posible que en el futuro, se estandaricen las condiciones experimentales, para poder llegar a una interpretación mucho más satisfactoria de los resultados y de su potencial predictivo de los que se obtienen *in vivo*. El potencial de las técnicas de simulación aumentaría también si se tienen en cuenta factores como el estado fisiológico del animal, sus necesidades nutritivas y, el volumen del rumen de la especie animal a la que va dirigida la dieta.

5.4.3. pH en los vasos de fermentación.

Los valores medios de pH de los fermentadores variaban entre 6,01 y 6,84 que corresponden, respectivamente a las dietas HACO y HO. Los valores más bajos corresponden a dietas que incluyen concentrado, lo que concuerda con las observaciones realizadas por diversos autores (MANN y ØRSKOV, 1975; HILTNER y DEHORITY, 1983; MOULD *et al.*, 1983; BOCHI-BRUM *et al.*, 1999). Estos valores son, sin embargo, superiores a los encontrados por HADJIPANAYIOTOU y ANTONIOU (1983) en el rumen de animales

alimentados con heno de alfalfa y un concentrado. Por el contrario, los valores encontrados en el presente trabajo coinciden con los observados por BOCHI-BRUM *et al.* (1999) al suministrar, a ovino, una dieta a base de heno de alfalfa y concentrado en la proporción 60:40. Estos valores son superiores a 6,0, que se considera como limitante de la actividad celulolítica ruminal y de la digestión de la fibra (STEWART, 1977; MOULD *et al.*, 1983; HOOVER, 1986; CHURCH, 1988). Los valores de pH observados en los fermentadores a los que se suministraban las dietas HA, HO y HOSUP son similares a los valores encontrados por ISAC *et al.* (1994) en animales que tomaban dietas de mediana calidad y por GARCÍA *et al.* (1994) en animales que pastoreaban en zonas semiáridas, donde predominaban los arbustos forrajeros y que recibían o no un concentrado. El pH encontrado en los fermentadores alimentados con las tres dietas referidas es superior a 6,30, indicativo de que la actividad celulolítica es predominante en los fermentadores, de acuerdo con las observaciones realizadas por TEJIDO *et al.* (2002).

5.4.4. Los protozoos en los fermentadores.

Las diferencias más importantes y obvias en cuanto a la ecología microbiana, entre el ambiente ruminal y los fermentadores es el drástico descenso de protozoos que tiene lugar en estos últimos (SLYTER y PUTNAM, 1967; HOOVER *et al.*, 1976a; CRAWFORD *et al.*, 1980a; HANNAH *et al.*, 1986; MANSFIELD *et al.*, 1995), llegándose incluso a su desaparición cuando el ritmo de dilución en el fermentador supera 1 volumen/24horas (CRAWFORD *et al.*, 1980). Las especies de holotricos desaparecen totalmente del fermentador ya que son muy vulnerables, dado que su tiempo de generación es relativamente elevado (WILLIAMS, 1986) y la homogeneidad en cuanto a las condiciones del fermentador en el que no se produce estratificación como si ocurre en el rumen.

El número de protozoos que se observan el día de comienzo de los ensayos en este trabajo corresponde directamente al encontrado en el líquido ruminal de ovino y caprino, con que se han inoculado los fermentadores. El número de protozoos, en esas condiciones es del mismo orden que los valores encontrados por YÁÑEZ RUIZ (2003), en los animales que tomaban heno de alfalfa. No se han encontrado diferencias significativas en el número de protozoos de los inóculos procedentes de ovino y de caprino. En los fermentadores de flujo continuo, las especies de holotricos desaparecen de los vasos de fermentación al tercer día de incubación, lo que concuerda con los valores observados por otros autores (SLYTER *et al.*, 1964; SLYTER y PUTNAM, 1967; MANSFIELD *et al.*, 1995). Las especies de entodiniomorfos disminuyen al prolongarse el tiempo de incubación, lo que coincide con

las observaciones realizadas por PREVOT *et al.* (1988) y CARRO *et al.* (1995), en fermentadores de flujo semicontinuo. Los protozoos totales desaparecen completamente del contenido de los fermentadores y de sus efluentes al final de los ensayos lo que coincide con los resultados obtenidos por BAS *et al.* (1990).

5.4.5. Características de los efluentes.

Los pesos y volúmenes diarios de los efluentes correspondientes a los fermentadores alimentados con las dietas HA, HACO, HACOP y HO son bastante homogéneos y superiores a los valores encontrados por MARTÍN GARCÍA (2001), con dietas a base de ODF u hoja de olivo. Los pesos y volúmenes, de los efluentes encontrados para los fermentadores que se alimentaban con la dieta HOSUP son menores pero, bastante similares a los valores encontrados por MARTÍN GARCÍA (2001) con dietas a base de orujo de dos fases y de hoja de olivo.

La composición química de los efluentes varía en función de la dieta experimental suministrada a los fermentadores. Los valores de la PB son elevados para las dietas a base de heno de alfalfa (HA, HACO, HACOP) y muy bajos con las dietas a base de hoja de olivo (HO, HOSUP). La cantidad de N-FAD es muy alta en los efluentes correspondientes a las dietas basadas en hoja de olivo. Los TCT encontrados en los efluentes que correspondían a la dieta HO son muy superiores a los valores observados por MARTÍN GARCÍA (2001), con hoja de olivo desecada a 60 °C. Esto podría deberse al efecto de la desecación; al diferente método utilizado en la determinación de los TCT, o a la cantidad de MS suministrada en cada trabajo. AHN *et al.* (1989) y NORTON y AHN (1997) observaron que al desecar muestras de arbustos, los TCT disminuyen. YÁÑEZ RUIZ, (2003) también han observado este efecto, al tratar hoja de olivo con distintas temperaturas.

La concentración de nitrógeno amoniacal en los fermentadores está asociada con factores tales como la velocidad de dilución del líquido (ISAACSON *et al.*, 1975), pH (HOOVER *et al.*, 1984), el tipo de carbohidratos (STERN *et al.*, 1978) o la fuente de nitrógeno (CHESTER-JONES *et al.*, 1990) fermentados o la síntesis de proteína microbiana.

La concentración de N-NH₃ en los efluentes encontrada en el presente trabajo varía dependiendo de la dieta suministrada a los fermentadores. Los valores correspondientes a la dieta HA son del mismo orden que las concentraciones encontradas por CHESTER-JONES *et al.* (1991) y por HONGERHOLT *et al.* (1998), en fermentadores alimentados con ensilado de maíz y heno de alfalfa y suplementados con un concentrado mixto o con pastos suplementados con granos de maíz o cebada, respectivamente. Sin embargo, esos valores

son ligeramente superiores a los considerados como mínimos para promover una máxima producción de proteína microbiana, establecidos por diversos autores (SATTER y SLATER, 1974; MILLER, 1982; RUSSELL y STROBEL, 1987). La sustitución de una parte del heno de alfalfa por el concentrado provoca una disminución de la concentración de N-NH₃. Este hecho ha sido también observado por otros autores *in vitro* (CHISTER-JONES *et al.*, 1990; STOKES *et al.*, 1991a) e *in vivo* (ANTONIOU y HADJIPANAYIOTOU, 1985; MOLINA ALCAIDE *et al.*, 2000; YÁÑEZ RUIZ, 2003).

Las concentraciones encontradas en los efluentes procedentes de fermentadores alimentados con dietas a base de heno de alfalfa son inferiores a los valores encontrados por YÁÑEZ RUIZ (2003), en ovino y caprino alimentados con las mismas dietas. Las bajas concentraciones de amonio encontradas en los fermentadores podrían deberse a la pérdida de nitrógeno en éste sistema (CRAWFORD *et al.*, 1980b; MARTÍN GARCÍA, 2001) o a una menor actividad proteolítica como han observado TEJIDO *et al.* (2002).

Las concentraciones de amonio, en los efluentes de fermentadores alimentados con dietas a base de hoja de olivo, son muy inferiores a los valores encontrados con las dietas a base de heno de alfalfa. La suplementación de la hoja de olivo con cebada y habas, aumenta esa concentración en los efluentes. Este hecho fue también observado por SRINIVAS y GUPTA (1997), *in vivo*, al suplementar paja de trigo con un concentrado mixto. Los valores derivados de la fermentación de la dieta HOSUP son superiores a los encontrados por MARTÍN GARCÍA (2001), en fermentadores alimentados con hoja de olivo y suplementados con torta de girasol. Las concentraciones encontradas en los fermentadores alimentados con las dietas HO y HOSUP están, incluso, por debajo de los valores considerados como mínimos (5 mg/dl) para promover un máximo crecimiento microbiano por SATTER y SLYTER (1974). No obstante, conviene tener en cuenta los diferentes valores de concentraciones óptimas de amonio que se han propuesto (SATTER y SLYTER, 1974; BAS *et al.*, 1980; CRAWFORD *et al.*, 1980b; OWENS y BERGEN, 1983; BALCELLS *et al.*, 1993b), dependiendo de factores tales como la disponibilidad del sustrato y las diferentes especies de bacterias que participen en la fermentación del alimento.

No existen diferencias significativas entre las concentraciones de N-NH₃ procedente de la fermentación de las dietas suministradas a los fermentadores que puedan atribuirse al origen del inóculo ruminal salvo por lo que respecta a la dieta HACOP que promueve concentraciones de amonio en los efluentes menores cuando los fermentadores se inoculaban con líquido ruminal de caprino en comparación con el de ovino (0,24 y 0,78 mg N-NH₃/100 ml, respectivamente). Esto podría deberse al efecto que el PEG tiene sobre la

disponibilidad de carbohidratos procedentes del orujo y a la mayor actividad microbiana en el rumen de caprino que en el de ovino, en relación a la degradación de los carbohidratos y que promovería una mayor asimilación de $N-NH_3$. Esto se ve reflejado en la producción de FND (17,7 y 19,2 g/día de FND para fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino y ovino, respectivamente).

5.4.5.1. Ácidos grasos volátiles.

La concentración y las proporciones de los distintos AGV caracterizan el tipo de fermentación que ha tenido lugar. Los principales sustratos de la fermentación que dan lugar a los AGV son los carbohidratos dietéticos aunque, los lípidos y las proteínas también contribuyen a la producción de los AGV. La proteína dietética tiene un papel muy importante en la producción de AGV, cuando es altamente degradada en el rumen. Las proteínas son hidrolizadas a aminoácidos y estos son desaminados antes de transformarse en AGV. De particular importancia son la formación de los ácidos isobutírico e isovalérico a partir de valina y leucina, respectivamente (FRANCE y SIDDONS, 1993). Estos AGV, de cadena ramificada, son esenciales para el crecimiento de algunas bacterias ruminales (HUNGATE, 1966; COTTA y HESPELL, 1986; RUSSELL y SNIFFEN, 1984; WALLACE y COTTA, 1988).

El patrón de fermentación está determinado por la población microbiana, que a su vez, es determinada en gran parte por la dieta, particularmente por el tipo de hidratos de carbono. Las dietas altamente fibrosas favorecen el crecimiento de las bacterias que producen acetato, mientras que las dietas que contienen gran porcentaje de concentrado favorecen el crecimiento de bacterias que producen el propiónato (FRANCE y SIDDONS, 1993).

Las concentraciones de AGV totales, así como sus correspondientes producciones, obtenidas en los efluentes de los fermentadores alimentados con dietas a base de heno de alfalfa son muy elevadas, en comparación con las derivadas de la fermentación de dietas a base de hoja de olivo.

Las concentraciones de AGV totales, encontradas en los efluentes de fermentadores alimentados con dietas a base de heno de alfalfa, son del mismo orden que los valores encontrados por HADJIPANAYIOTOU y ANTONIOU (1983) suministrando a animales dietas a base de heno de alfalfa. Al sustituir parte del heno de alfalfa por concentrado, en nuestros ensayos, la concentración de acético disminuye y las de los ácidos propiónico y butírico aumentan. Estas observaciones coinciden también con los resultados obtenidos por

HADJIPANAYIOTOU y ANTONIOU (1983). El cambio en el patrón de la fermentación ruminal hacia un aumento en la proporción molar de propionato y una disminución de la proporción molar de acético, en respuesta a la sustitución de parte del forraje por concentrado, también fue observado por DAVIS (1979) y MERCHEN *et al.*, (1986). El aumento en la proporción molar de propionato, observado en nuestros ensayos, es probablemente debido a la inclusión de carbohidratos fácilmente fermentables que provienen de la cebada que incluye el concentrado. La proporción molar de acético sigue siendo muy alta en comparación con las de propiónico y butírico en aquellos fermentadores alimentados con las dietas HA y HACO (79:23:12 y 62:29:17, para acético, propiónico y butírico, respectivamente), lo que indica que la actividad celulolítica es predominante. El aumento en las concentraciones de isobutírico e isovalérico podría corroborar la idea de que la fermentación predominante es de carácter celulolítico, ya que estos AGV son sintetizados por bacterias celulolíticas a partir de valina y leucina, respectivamente.

Las producciones de AGV totales y las eficiencias de producción de estos, encontradas en este trabajo en los fermentadores alimentados con dietas a base de heno de alfalfa, son del mismo orden que los valores encontrados por MOLINA ALCAIDE *et al.* (1999) en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino y caprino y alimentados con dietas que incluían heno de alfalfa, pulpa de remolacha y avena. Sin embargo, esas eficiencias, son superiores a los valores encontrados por MARTÍN GARCÍA (2001) en fermentadores de flujo continuo, alimentados con orujo de aceituna de dos fases. La relación C2/C3 es del orden de 2,9, ligeramente superior a los valores encontrados por MARTÍN GARCÍA (2001) en fermentadores alimentados con orujo de aceituna de dos fases e inferior a los valores encontrados *in vivo* con dietas de mediana calidad (ISAC *et al.*, 1994).

La concentración media de AGV totales e individuales, en los fermentadores alimentados con dietas a base de heno de alfalfa, son muy similares cuando el inóculo procede de ovino o de caprino lo que coincide con las observaciones de distintos autores (ANTONIOU y HADJIPANAYIOTOU, 1985; MOLINA ALCAIDE *et al.*, 1999, 2000; YÁÑEZ RUIZ, 2003).

Las producciones de AGV, en los fermentadores de flujo continuo alimentados con hoja de olivo (HO), son inferiores a los valores encontrados en este trabajo cuando se suministraban dietas a base de heno de alfalfa. Sin embargo, llama la atención la cantidad de isovalérico obtenido con la dieta HO que es, incluso, superior a los valores obtenidos con dietas a base de heno de alfalfa. Las concentraciones de AGV totales son inferiores a las

encontradas por MOLINA ALCAIDE *et al.* (1997b) y por SRINIVAS y GUPTA (1997), en animales que consumían pastos de baja calidad y paja de trigo, respectivamente, y por MARTÍN GARCÍA (2001) utilizando fermentadores de flujo continuo alimentados con hoja de olivo desecada a 60°C. La desecación de la hoja podría inactivar parte de sus polifenoles como se ha observado en nuestro laboratorio (MOLINA ALCAIDE, 2003 en prensa; YÁÑEZ RUIZ, 2003) ya que los taninos condensados totales ejercen efectos negativos sobre la producción de AGV (AKIN *et al.*, 1988; SILANIKOVE *et al.*, 1996b). YÁÑEZ RUIZ (2003) estudió el patrón de fermentación ruminal en animales alimentados con hoja de olivo y observó que las concentraciones de AGV en ovino y caprino eran similares a lo largo del día, puesto que no existe otra fuente de energía que produzca picos de fermentación. El valor medio de AGV totales era ligeramente superior al valor medio encontrado en el presente trabajo (27, 9 y 16 mmol/l, respectivamente).

Por lo que respecto al origen del inoculo ruminal de ovino o caprino no se aprecian diferencias significativas en la producción de AGV totales e individuales en los fermentadores alimentados con la dieta HO. Estos resultados coinciden con lo observado por ANTONIOU y HADJIPANAYIOTOU (1985), en caprino y ovino alimentados con dietas de mala calidad. MARTÍN GARCÍA (2001), a excepción de la producción de isobutírico, tampoco observó grandes diferencias significativas en las producciones de AGV totales e individuales que pudieran deberse al origen del inoculo ruminal utilizado en los fermentadores de flujo continuo que se alimentaban con hoja de olivo. YÁÑEZ RUIZ (2003), *in vivo*, tampoco ha observado importantes diferencias en la concentración ruminal de AGV totales e individuales cuando ovino y caprino se alimentaban con hoja de olivo.

La suplementación de hoja de olivo con habas y cebada (dieta HOSUP) aumentó la producción de AGV totales e individuales. Las concentraciones de AGV, observadas cuando los fermentadores se alimentaron con la dieta HOSUP, son del mismo orden que los valores obtenidos por ANTONIOU y HADJIPANAYIOTOU (1985) con animales que tomaban dietas de mediana calidad. Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con los valores referidos por SRINIVAS y GUPTA (1997) cuando suministraban a animales dietas a base de paja de trigo, suplementadas con un concentrado mixto. La suplementación de una dieta altamente fibrosa con un concentrado disminuye la proporción de acético e incrementa las de propiónico y butírico (DOYLE *et al.* 1988; SRINIVAS y GUPTA, 1997). Este cambio puede mejorar la utilización de energía ya que la concentración de propionato muestra una relación positiva con la eficiencia de utilización de energía (VAN HOUTERT, 1993). Sin embargo, la suplementación de HO con cebada y

habas aumenta la proporción de todos los AGV individuales, probablemente no solo porque la suplementación aporta más energía fermentable a los microorganismos ruminales sino también porque los carbohidratos estructurales de la hoja de olivo se estén degradando más. El aumento de las concentraciones de isobutírico e isovalérico, esenciales para el crecimiento de bacterias celulolíticas (HUME, 1970; BRYANT, 1973; ALLISON, 1980; RUSSELL y SNIFFEN, 1984; WALLACE y COTTA, 1988; GRISWOLD *et al.*, 1996), podría atribuirse también a la degradación de los carbohidratos estructurales de la hoja de olivo.

La adición de PEG a los fermentadores que recibían la dieta HACO (dieta HACOP) aumenta la producción de AGV, la relación acético/propiónico y la eficiencia de producción de AGV. El concentrado incluye orujo y éste contiene taninos que pueden afectar negativamente a la fermentación ruminal de los carbohidratos, actuando directamente sobre las paredes celulares de las bacterias (HENIS *et al.*, 1964; JONES *et al.*, 1994), sobre las enzimas de los microorganismos ruminales (TAGARI *et al.*, 1965; BAE *et al.*, 1993) o sobre las paredes celulares (SILANIKOVE *et al.*, 1996b; SALAWU *et al.*, 1999a). Por ello, la adición de PEG inactivaría esos compuestos fenólicos. Estos resultados concuerdan con los observados por otros autores (NORTON y AHN, 1997; BEN SALEM *et al.*, 1999a; GETACHEW *et al.*, 2000; YÁÑEZ RUIZ, 2003).

5.4.5.2. Producción de las distintas fracciones nitrogenadas.

Las producciones de nitrógeno total en los efluentes de los fermentadores alimentados con las dietas a base de heno de alfalfa son muy superiores a las obtenidas en aquellos que recibían las dietas a base de hoja de olivo. También son superiores a los valores encontrados por MERRY *et al.* (1990) en los efluentes de fermentadores alimentados con paja de cebada, suplementada con cebada, tapioca y urea o con cebada, tapioca, urea y harina de pescado. Por el contrario, los valores encontrados en el presente trabajo, con dietas a base de heno de alfalfa, son inferiores a los obtenidos por CHESTER-JONES *et al.* (1991) y por HONGERHOLT *et al.* (1998) en fermentadores alimentados con dietas a base de maíz o pulpa de remolacha azucarera, suplementadas con nitrógeno o con dietas a base de pastos herbáceos de buena calidad, suplementados con maíz, cebada grano y melazas. La sustitución de una parte del heno de alfalfa por concentrado no produjo una mejora en la producción de nitrógeno total. Sin embargo, la adición de PEG a los fermentadores alimentados con la dieta HACO aumentó la producción de nitrógeno total. Ello podría deberse al efecto de los taninos que provienen del orujo que pueden unirse a las proteínas

(SPENCER et al., 1988) y a las enzimas de los microorganismos ruminales (BAE et al., 1993). La adición de PEG inactivaría los efectos de esos compuestos fenólicos.

La suplementación de la hoja de olivo con habas y cebada (dieta HOSUP) aumentó la producción de nitrógeno total, alcanzándose valores superiores a los encontrados por MOLINA ALCAIDE *et al.* (1996) en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de vacuno y alimentados con dietas a base de arbustos suplementados con nitrógeno.

Las producciones de N-NH₃ en los efluentes de fermentadores alimentados con dietas a base de heno de alfalfa son inferiores a las descritas por varios autores (KOMISARCZUK *et al.*, 1987b; HUSSEIN *et al.*, 1991; CARRO y MILLER, 1999b), en fermentadores alimentados con dietas de mediana-buena calidad. La sustitución de una parte del heno de alfalfa por el concentrado produjo una disminución de la producción de N-NH₃ en los efluentes. Este efecto también fue observado por MOLINA ALCAIDE *et al.* (2000) y por YÁÑEZ RUIZ (2003), *in vivo*, al sustituir parte del heno de alfalfa por pulpa de remolacha y avena grano y, por concentrado a base de cebada grano y orujo de “dos fases”, respectivamente. La disminución de la producción de nitrógeno amoniacal observada en los efluentes de los fermentadores que recibían la dieta HACO podría deberse a un mejor acoplamiento entre la energía liberada de los carbohidratos fermentados y la disponibilidad de nitrógeno que proviene de la degradación de la proteína del alimento y que son utilizados para la síntesis de proteína microbiana.

La adición de PEG a los fermentadores alimentados con la dieta HACO disminuye las producciones de nitrógeno amoniacal en los efluentes cuando el inóculo era líquido ruminal de caprino y aumenta en aquellos fermentadores inoculados con líquido ruminal de ovino. Esto podría deberse a diferentes razones: i) la mayor capacidad fermentativa que tiene caprino con respecto a ovino en cuanto a la degradación de carbohidratos. El hecho de que haya una mejor degradación de los carbohidratos promueve un mejor acoplamiento entre la energía y el nitrógeno y, por tanto, una mayor utilización de N-NH₃ para una mayor síntesis de proteína microbiana en los fermentadores que se inoculan con líquido ruminal de caprino; o ii) la mayor sensibilidad de la especie ovina a los taninos que provienen del orujo, frente a la caprina como han sugerido algunos autores (SILANIKOVE et al., 1996b; SILANIKOVE, 2000).

La suplementación de la hoja de olivo con grano de cebada y habas aumenta la producción de nitrógeno amoniacal. Este hecho fue observado también por SRIVINAS y GUPTA (1997), *in vivo*, al suplementar paja de trigo con un concentrado mixto. Las

producciones de $N-NH_3$, derivadas de la fermentación de la dieta HOSUP, son superiores a los valores encontrados por MARTÍN GARCÍA (2001) con dietas basadas en hoja de olivo y suplementadas con harina de torta de girasol. El aumento en la producción de $N-NH_3$ con la fermentación de la dieta HOSUP podría deberse al efecto positivo que tienen los carbohidratos fácilmente fermentables sobre la fermentación de materiales lignocelulósicos, como han observado varios autores (STEWART et al., 1979; DEMEYER, 1981; BARRIO et al., 2000). La fermentación de la dieta HOSUP promueve valores más elevados cuando los fermentadores se inoculan con líquido ruminal de ovino. Estas observaciones corroboran las realizadas por GARCÍA *et al.* (1994) con animales que pastaban en zonas semiáridas y a los que se suplementaba con cebada grano.

Se ha observado que las producciones de nitrógeno no amoniacal siguen el mismo comportamiento que las producciones de nitrógeno total y amoniacal ya que es un valor que deriva de la diferencia entre los dos parámetros. Las producciones de NNA en los efluentes de fermentadores alimentados con dietas a base de heno de alfalfa son superiores a los valores encontrados por CARRO y MILLER (1999b), en fermentadores de flujo semicontinuo, alimentados con dietas a base de fibra neutro detergente y suplementados con nitrógeno y también del mismo orden que los encontrados por HUSSEIN *et al.* (1991), en fermentadores inoculados con líquido ruminal de vacuno y alimentados con dietas a base de heno de alfalfa, suplementados con nitrógeno y energía. Sin embargo, esas producciones son inferiores a los valores encontrados por CHESTER-JONES *et al.* (1991), en fermentadores inoculados con líquido ruminal de vacuno y alimentados con dietas a base de maíz o pulpa de remolacha azucarera, suplementadas con nitrógeno. Los valores encontrados en los efluentes procedentes de fermentadores alimentados con la dieta HOSUP son superiores a los encontrados por MARTÍN GARCÍA (2001) con hoja de olivo suplementada con nitrógeno o tratada con PEG.

Las producciones de ácido diaminopimélico (DAPA), en los efluentes de los fermentadores alimentados con las dietas basadas en heno de alfalfa, son superiores a los valores encontrados por MOLINA ALCAIDE *et al.* (1996) y MARTÍN GARCÍA (2001) en los fermentadores alimentados con arbustos forrajeros y con subproductos del olivar, respectivamente; y del mismo orden que los valores encontrados por CZERKAWSKI y BRECKENRIDGE (1979). La sustitución de parte del heno de alfalfa por el concentrado aumenta los valores de N-DAPA, pero este aumento no es significativo. Sin embargo, la adición de PEG a los fermentadores alimentados con la dieta HACO, aumenta la producción de N-DAPA en los inoculados con líquido ruminal de ovino aunque en los

inoculados con el de caprino no se observa una mejora. Esto podría indicar que la especie ovina es más sensible a la presencia de taninos en la dieta, y que caprino muestra una mayor adaptación a nivel ruminal a este tipo de dietas, como han observado varios autores (SILANIKOVE *et al.*, 1996b; SILANIKOVE, 2000). La adición de PEG neutraliza los efectos adversos de los taninos de la dieta como han observado algunos autores (MAKKAR *et al.*, 1995b; KHAZAAL *et al.*, 1996; PROVENZA *et al.*, 2000) y, por tanto, aumenta la disponibilidad de carbohidratos estructurales y de nitrógeno para las bacterias celulolíticas.

Con la de hoja de olivo, la producción de N-DAPA es del mismo orden que la encontrada por MOLINA ALCAIDE *et al.* (1996) en fermentadores alimentados con arbustos forrajeros. La suplementación de la dieta HO con habas y cebada aumenta los valores de N-DAPA, pero estos son muy inferiores a los encontrados por CZERKAWSKI y BRECKENRIDGE (1979) en los efluentes de fermentadores inoculados con líquido ruminal de ovejas y alimentados con dietas a base de concentrado. El aumento en las producciones de N-DAPA, podría deberse a un mejor acoplamiento entre la disponibilidad de energía y nitrógeno para el crecimiento bacteriano promovido por la suplementación. Ese mejor acoplamiento conduciría a una mayor degradación de los carbohidratos estructurales de la hoja de olivo.

El mismo comportamiento observado para las producciones de N-DAPA, se ha producido con la producción del otro marcador microbiano utilizado: el nitrógeno púrico (N-BP).

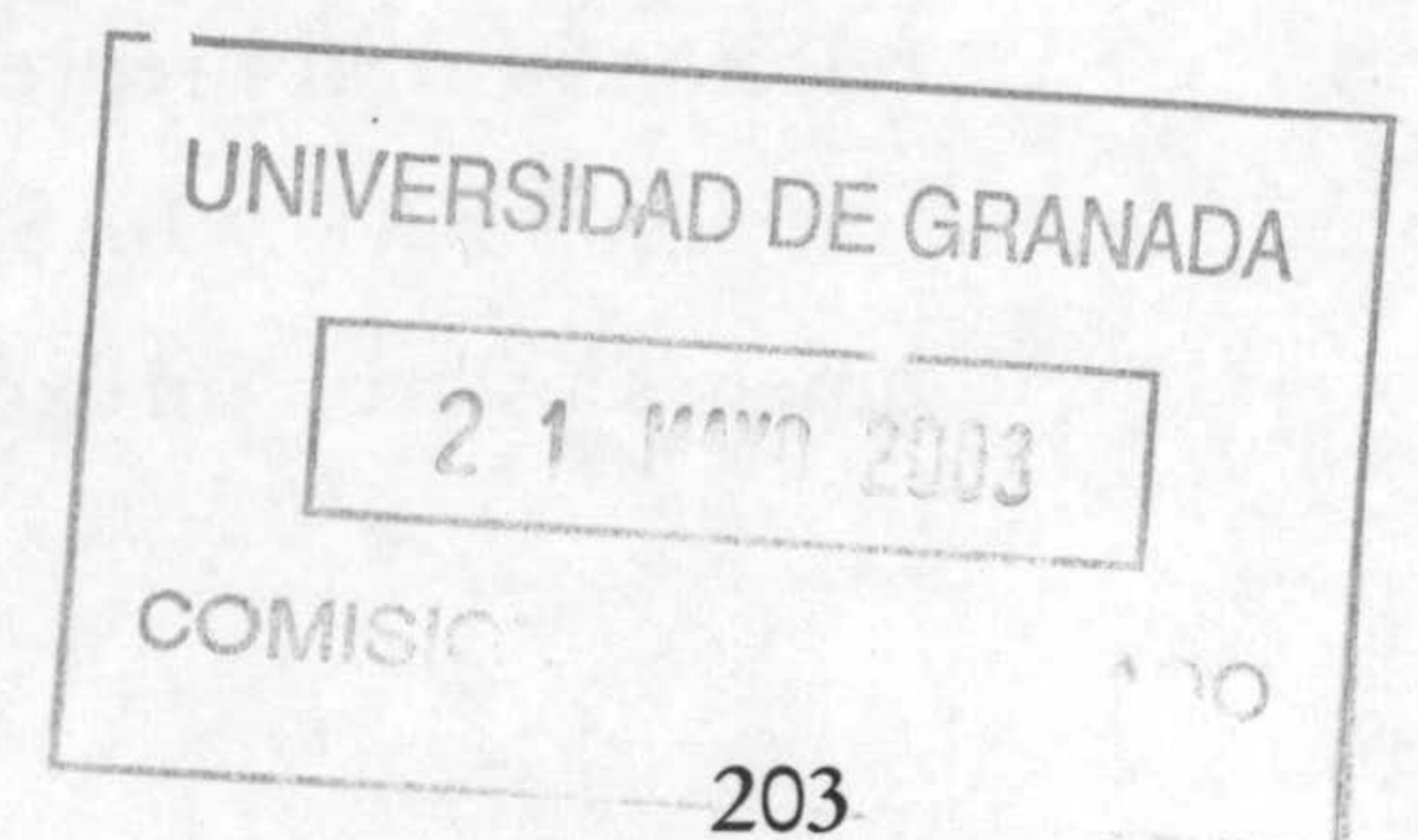
La producción de nitrógeno aminoacídico en los efluentes de fermentadores alimentados con dietas a base de heno de alfalfa es superior a la obtenida con las dietas a base de hoja de olivo.

El flujo de aminoácidos en los fermentadores que recibían las dietas a base de heno de alfalfa es inferior a los valores encontrados por otros autores (HANNAH *et al.*, 1986; BAS *et al.*, 1989; CHISTER-JONES *et al.* 1990; MANSFIELD *et al.*, 1994; CALSAMIGLIA *et al.*, 1995). Estas diferencias podrían deberse a las que existen en cuanto a las cantidades de aminoácidos suministrados por estos autores, ya que ellos administraban 75 g MS de las dietas frente a los 55 g MS utilizados en este trabajo. También, podrían ser debidas a la distinta calidad de las dietas utilizadas en cada trabajo. La sustitución de parte del heno de alfalfa por el concentrado aumenta el flujo de AATOT, AAE, AANE a los efluentes aunque este aumento no es significativo. La adición de PEG a los fermentadores que se alimentaban con la dieta HACO aumentó de una manera muy significativa el flujo de

AATOT, AANE, AAE, Lis y Met en los fermentadores inoculados con líquido ruminal de ovino mientras que este aumento no es significativo en los fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino. Esto podría indicar una mejor adaptación, a nivel ruminal, de la especie caprina frente a la ovina en cuanto a la presencia de los taninos que pueden estar presentes en orujo que incluye la dieta. Varios autores (BROOKER et al., 1994; TJAKRADIDJAJA et al., 1997; ODENYO et al., 2001) han aislado cepas de bacterias ruminales de caprino que se adaptan a la presencia de taninos, o incluso que degradan el complejo tanino-proteína como *Streptococcus caprinus* (BROOKER et al., 1994). Estas bacterias no se han encontrado en el rumen de ovino. Las diferencias degradativas que existen entre ovino y caprino a nivel ruminal con la dieta HACO, incluso, desaparecen cuando se adicionaba el PEG. Este hecho también fue observado por varios autores (MOHAMMED, 1982; HADJIPANAYIOTOU y ANTONIOU, 1998b; MOLINA ALCAIDE et al., 2000) con alimentos de mediana-buena calidad.

El aumento significativo de la producción de metionina en los fermentadores alimentados con la dieta HACOP podría deberse al origen bacteriano de este aminoácido ya que MARTÍN GARCÍA (2001) ha observado que este aminoácido no se degrada en el rumen.

La producción de aminoácidos totales en los efluentes de fermentadores alimentados con la hoja de olivo es del mismo orden que la obtenida por MOLINA ALCAIDE et al. (1996) cuando suministraba a los fermentadores arbustos forrajeros sin suplementar, y son superiores a los valores encontrados por MARTÍN GARCÍA (2001) en los fermentadores alimentados con hoja de olivo desecada a 60°C. Esto podría deberse al efecto de la desecación que deteriora la calidad de proteína. La suplementación de hoja de olivo con habas y cebada aumenta el flujo de AATOT, AANE, AAE, Lis y Met. Este aumento es significativo para todos los parámetros salvo para la Met. Las producciones de AATOT, derivados de la dieta HOSUP, son superiores a los valores encontrados por MOLINA ALCAIDE et al. (1996), en fermentadores alimentados con arbustos suplementados con urea o torta de girasol y por MARTÍN GARCÍA (2001), con hoja de olivo o orujo de aceituna suplementados, con urea o torta de girasol. Este aumento podría indicar el efecto positivo que tienen los carbohidratos fácilmente degradables sobre la degradación de la hoja de olivo, como han demostrado otros autores (DEMEYER, 1981; BARRIOS et al., 2000; FONDEVILA et al., 2002) con los mismos tipos de alimentos.



5.5. COMPOSICIÓN DE LAS BACTERIAS AISLADAS DE LOS FERMENTADORES.

La composición química de las fracciones BAL, BAS y BE fue diferente en todos los ensayos.

El contenido en nitrógeno y las concentraciones de adenina, guanina y de bases púricas totales mostraron valores más elevados en las bacterias de la fracción BAL que en las BAS, coincidiendo con lo observado por otros autores (MERRY y MCALLAN, 1983; KOMISARCZUK *et al.*, 1987c; LEGAY-CARMIER y BAUCHART, 1989; CECAVA *et al.*, 1990; OLUBOBOKUM y CRAIG, 1990; MARTIN *et al.*, 1994; MOLINA ALCAIDE *et al.*, 1996; YANG *et al.*, 2001) en lo que se refiere al contenido en nitrógeno, y por MERRY y MCALLAN (1983), LEGAY-CARMIER y BAUCHART (1989), PÉREZ *et al.* (1996a, 1998a), MARTÍN-ORÚE *et al.* (1998), RODRÍGUEZ *et al.* (2000), CARRO y MILLER (2002) en lo relativo al contenido en bases púricas. Las diferencias en el contenido de N entre BAS y BAL podrían deberse a la gran cantidad de polisacáridos que existen en las BAS y que podrían diluir el contenido en N. Las diferencias en el contenido en BP entre las fracciones BAL y BAS parecen deberse a diferentes razones: i) las características intrínsecas de las diferentes especies que integran cada fracción bacteriana. Este hecho fue observado también por OBISPO y DEHORITY (1999); las bacterias gram-negativas contienen más N-RNA que las bacterias gram-positivas (ARAMBEL *et al.*, 1982); ii) las variaciones en la actividad metabólica resultantes de un diferente ritmo de crecimiento de las bacterias; las BAS presentan menor ritmo de crecimiento que las BAL (CECAVA *et al.*, 1990) ya que estas últimas tienen un acceso fácil a sustratos de degradación rápida.

La obtención de muestras bacterianas a partir de la fase sólida puede proporcionar una información adicional y complementaria a la que proporcionan las BAL. Además, puede contribuir, a explicar variaciones relativas a marcadores y métodos de estimación de la síntesis de proteína microbiana, citadas en la bibliografía. Sin embargo, algunos autores han ido más allá y han intentado aislar un extracto bacteriano representativo que incluyese bacterias asociadas a las fases líquida y sólida del rumen o del efluente (CECAVA *et al.*, 1990; MOLINA ALCAIDE *et al.* 1996; CARRO y MILLER, 2002; RANILLA y CARRO, 2003). En el presente trabajo también se ha intentado aislar un extracto bacteriano representativo de efluentes (BE) de los fermentadores de flujo continuo. En esa fracción bacteriana, la relación N-BP:N representa, en general, un valor intermedio entre los encontrados en las fracciones BAL y BAS. Este hecho fue también observado por CARRO y MILLER (2002) quienes aislaron un extracto bacteriano que incluía bacterias asociadas a las fases sólida y

líquida de la digesta, obtenida de un fermentador de flujo semicontinuo. Sin embargo, CECAVA *et al.* (1990) observaron que el valor N-BP:N de la fracción bacteriana "mixta", aislada en ternero, era similar a la encontrada en las BAS que se aislaban en el contenido ruminal de los mismos animales.

En cuanto al efecto de las dietas suministradas a los fermentadores sobre la composición de las fracciones bacterianas, cabe destacar que en los fermentadores alimentados con HO el contenido en bases púricas de BAS y BE, aisladas en los fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino, es muy superior al de esas mismas fracciones bacterianas aisladas en los fermentadores inoculados con líquido ruminal de ovino. Esto podría deberse a la mayor capacidad degradativa de caprino, en relación al ovino, con este tipo de alimentos. Cabe destacar también que al suplementar la dieta HO con habas y cebada, las diferencias mencionadas se diluyen aunque el inóculo de la especie caprina sigue manteniendo una ligera superioridad. Las dietas a base de hoja de olivo y suplementadas con habas y cebada presentan valores muy elevados e incluso superiores a los valores correspondientes a las dietas basadas en heno de alfalfa y concentrado, lo que podría deberse a la mayor disponibilidad de energía y proteína en las primeras. La relación BP:N disminuye al sustituir, en la dieta suministrada a los fermentadores, parte del heno del alfalfa por el concentrado, lo que coincide con lo observado por SMITH y MCALLAN (1974) al incrementar la proporción del concentrado en las dietas suministradas a animales. Ello podría ser una consecuencia de cambios cualitativos en la población microbiana. MCALLAN y SMITH (1976b) y HVELPLUND (1986) demostraron que es posible alterar la composición química de las bacterias ruminales manipulando las dietas suministradas a los rumiantes.

El contenido en N-DAPA es inferior en las BAS que en las BAL de acuerdo con lo observado por varios autores (MERRY y MCALLAN, 1983; FIRKINS *et al.*, 1987; OLUBOBOKUN *et al.*, 1988; LEGAY-CARMIER y BAUCHART, 1989; MARTIN *et al.*, 1994; VOLDEN y HARSTAD, 1998). Esto podría ser consecuencia de las diferencias entre especies bacterianas mayoritarias en ambas poblaciones. Los valores de N-DAPA encontrados en este trabajo para las fracciones BAL, BAS y BE están dentro del rango obtenido por HVELPLUND (1986) (0,30 – 0,91 g N-DAPA/100g N) al aislar 49 extractos bacterianos mixtos del rumen de vacuno.

La composición en N-DAPA de las bacterias aisladas de los efluentes (BE) y de las aisladas de los fermentadores (BAS y BAL) alimentados con dietas a base de heno de alfalfa, son superiores a la de las mismas fracciones aisladas cuando se ensayó hoja de olivo, salvo para las BAL. Sin embargo, al suplementar hoja de olivo con habas y cebada, los

valores de N-DAPA aumentan y llegan a ser similares a los derivados de las dietas basadas en heno de alfalfa, salvo para la fracción BAS aislada en fermentadores inoculados con líquido ruminal de ovino y alimentados con la dieta HOSUP que es menor que podría deberse a una subestimación analítica en la determinación N-DAPA. Los valores de N-DAPA de las BE, BAS y BAL, aisladas de los fermentadores alimentados con dietas a base de hoja de olivo, son del mismo orden que los encontrados por MOLINA ALCAIDE *et al.* (1996) en fermentadores inoculados con líquido ruminal de vacuno y alimentados con arbustos forrajeros, suplementados con distintas fuentes de nitrógeno.

Las diferencias, en las proporciones de N aminoacídico, entre las dos poblaciones bacterianas reflejan la presencia de diferentes especies bacterianas en las fracciones BAS y BAL. Las proporciones de nitrógeno aminoacídico en BAS, BAL y BE oscilan entre 35 y 77% del nitrógeno total bacteriano. Las proporciones de nitrógeno aminoacídico bacteriano más elevadas corresponden a los fermentadores que se alimentaban con las dietas a base de heno de alfalfa y, los valores más bajos, a aquellas fracciones bacterianas que se aislaron en fermentadores que se alimentaban con las dietas a base de hoja de olivo. Estas diferencias podrían reflejar diferencias en la disponibilidad de sustratos para los microorganismos ruminales (SMITH, 1975; HVELPLUND, 1986) y en las especies bacterianas que se desarrollan con las distintas dietas (CZERKAWSKI, 1976). HVELPLUND (1986) encontró proporciones que oscilaban entre 62 y 72% de nitrógeno bacteriano al aislar 49 extractos "mixtos" bacterianos del rumen de vacuno. Estos valores son superiores a los encontrados en este trabajo con las dietas a base de hoja de olivo, probablemente como consecuencia de la gran cantidad de grasa que contiene la hoja utilizada en el presente trabajo (8,03%) y del efecto negativo que tienen estas grasas sobre la actividad de la microbiota ruminal. Las proporciones de nitrógeno aminoacídico bacteriano, en las fracciones aisladas de los fermentadores alimentados con dietas a base de heno de alfalfa, coinciden con los valores obtenidos por KORHONEN *et al.* (2002), en vacuno alimentado con forraje y suplementado con cebada grano. Estos valores están también dentro del rango obtenido por CLARCK *et al.* (1992) (54,9 – 86,7 Naa bacteriano/100 g N total) en una revisión de los principales estudios en los que se determinaba la composición aminoacídica de 441 extractos bacterianos correspondientes a animales que ingirieron 61 dietas diferentes.

Con la dieta HO las proporciones de nitrógeno aminoacídico en las fracciones BAL y BE son superiores en los fermentadores incubados con líquido ruminal de caprino que de ovino. Esto podría reflejar la mayor capacidad degradativa y de producción de proteína

microbiana que tiene caprino en relación a ovino cuando reciben este tipo de alimentos (EL HAG, 1976; HADJIPANAYIOTOU y ANTONIOU, 1983).

5.6. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA BACTERIANA.

La cuantificación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen es uno de los puntos clave en todos los Sistemas de Valoración Proteica de Alimentos para Rumiantes. Sin embargo, resulta muy difícil determinar *in vivo* esta fracción ya que se encuentra asociada en el intestino delgado a las proteínas de origen alimenticio y endógeno. La simulación del rumen *in vitro* permite disminuir las fuentes de posibles contaminaciones del nitrógeno de origen bacteriano y, por tanto, cuantificar la síntesis de proteína bacteriana, puesto que las proteínas de origen endógeno y protozoario desaparecen.

Para la cuantificación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen se debería partir de una muestra microbiana que fuese representativa de las bacterias asociadas, tanto a la fase líquida (BAL) como a la fase sólida (BAS) del contenido ruminal. En este trabajo se ha utilizado una muestra de la fracción BE (bacterias aisladas a partir de los efluentes) para la estimación de la producción bacteriana. Esta muestra presenta valores intermedios entre los que BAS y BAL en cuanto a su composición y, por lo tanto, parece razonablemente representativo del conjunto de bacterias ruminales que ejercen su actividad en los fermentadores.

Se han utilizados métodos y marcadores muy diversos para determinar la síntesis de proteína microbiana. Los resultados son muy variables y, a veces, contradictorios. En este trabajo se han empleado, de manera comparativa, los marcadores más comunes: DAPA (CZERKAWSKI, 1974) y bases púricas (ZINN y OWENS, 1986), para diferenciar entre la proteína microbiana y la dietética. STERN *et al.* (1986) compararon los valores obtenidos con ambos marcadores microbianos y observaron que su empleo conducía a estimaciones de la cantidad de proteína microbiana sintetizada en el rumen, diferentes.

La producción de nitrógeno total y aminoacídico en las bacterias así como su eficiencia de producción expresada como g de nitrógeno aminoacídico bacteriano por kg de CHO digeridos, en los efluentes y estimada a partir del ácido diaminopimélico (DAPA) son superiores en aquellos fermentadores que se alimentaban con dietas basadas en heno de alfalfa que cuando se suministraban dietas a base de hoja de olivo. Las producciones de nitrógeno total bacteriano en los fermentadores alimentados con dietas a base de heno de alfalfa son del mismo orden que los valores encontrados por STOKES *et al.* (1991a), en fermentadores de flujo continuo alimentados con dietas a base de maíz y harina de

cacahuete. Esas producciones son inferiores, sin embargo, a las encontradas por CHESTER-JONES *et al.* (1990) en fermentadores alimentados con dietas a base de ensilado de maíz, alfalfa granulada y un concentrado. La eficiencia de producción de Naa bacteriano (g/kg CHOD) con la dieta HA presenta valores similares a los encontrados por MADSEN *et al.*, (1995) en una revisión bibliográfica. La sustitución de parte del heno de alfalfa por el concentrado aumenta la producción de proteína bacteriana y su eficiencia de síntesis con respecto a la dieta que solo contenía heno de alfalfa. Este aumento fue también observado por SRINIVAS y GUPTA (1997) *in vivo*, al suplementar paja de trigo con un concentrado. Esto podría deberse a una mejora en el acoplamiento entre la energía liberada de carbohidratos y el nitrógeno por la degradación del alimento suplementado. Las producciones derivadas de la fermentación de la dieta HO son del mismo orden que los valores encontrados por KARUNANANDAA y VARGA (1996) en fermentadores a los que se suministraban dietas a base de paja de cereal. La suplementación de hoja de olivo con habas y cebada aumenta la producción del nitrógeno bacteriano en los fermentadores. Este hecho fue también observado por MOLINA ALCAIDE *et al.* (1996) en fermentadores alimentados con arbustos al suplementar con torta de girasol. Los valores derivados de la fermentación de la dieta HOSUP son del mismo orden que los valores encontrados por MERRY *et al.* (1990) al suministrar a los fermentadores paja y grano de cebada y tapioca.

La adición de PEG a los fermentadores alimentados con la dieta HACO, aumenta la producción de nitrógeno bacteriano en aquellos inoculados con líquido ruminal de ovino. Sin embargo, los valores obtenidos en los fermentadores que se inoculaban con líquido ruminal de caprino no representaban una mejora que pudiera asociarse a la presencia de PEG. De nuevo encontramos un indicio de que la especie ovina es más sensible a la presencia de taninos en la dieta y que el caprino muestra una mayor adaptación a nivel ruminal a este tipo de alimento coincidiendo con las observaciones realizadas por diversos autores (BROOKER *et al.*, 1994; SILANIKOVE *et al.*, 1996b; SILANIKOVE, 2000)

En el presente trabajo, se ha utilizado también el nitrógeno púrico (N-BP) para determinar la síntesis de proteína bacteriana en los fermentadores. Con este marcador, la producción comparativa de nitrógeno bacteriano promovida por las distintas dietas experimentales ha tenido la misma evolución que cuando se emplea DAPA. No obstante, los valores de producción encontrados, utilizando el nitrógeno púrico son muy elevados, en comparación con los estimados a partir del N-DAPA, para las dietas (HACO y HACOP). STERN *et al.* (1986) y ILLG, (1990) compararon la síntesis de proteína microbiana utilizando los dos marcadores microbianos (N-DAPA *vs* las purinas) y observaron que también era

muy diferente encontrándose valores más elevados cuando se utilizó DAPA en comparación con las purinas. Estos autores achacaron las diferencias a la lisis de las bacterias en el rumen y a la pérdida del contenido celular (GOMEZ et al., 1991) o al metabolismo del DAPA por los microorganismos ruminales (DENHOLM y LING, 1989) que provocaban un aumento de la relación DAPA:N. Sin embargo, nuestros resultados son contrarios a los encontrados por esos autores (STERN et al., 1986; ILLG, 1990). Pensamos que las diferencias en nuestros ensayos podrían deberse a una contaminación de nitrógeno púrico bacteriano por nitrógeno púrico dietético, en este sentido, algunos autores (SMITH et al., 1978; PÉREZ et al., 1997a) señalan que hasta un 30% de flujo duodenal de purinas puede ser de origen alimenticio. Las diferencias encontradas entre los valores estimados mediante el uso de ambos marcadores microbianos (DAPA y bases púricas) pueden deberse también a la proporción de las especies bacterianas presentes, ya que las bacterias gram-positivas no contienen DAPA (WORK y DEWEY, 1953). El hecho de que la digestibilidad de bases púricas encontrada en estas dos dietas (HACO y HACOP) es negativa confirmaría la hipótesis de una contaminación dietética. Para la dieta HA y las basadas en hoja de olivo, no hay importantes diferencias entre los resultados obtenidos con los dos marcadores utilizados.

En este trabajo se ha utilizado, además, una aproximación basada en la fórmula empleada por CARRO y MILLER (1999b) para estimar la síntesis de proteína microbiana en los fermentadores: la diferencia entre las producciones de NNA y de nitrógeno ligado a la fibra ácido detergente, asumiendo que el N-FAD presente en el efluente es la única fracción de origen dietético. En este caso, las producciones de nitrógeno total y de nitrógeno aminoacídico son superiores en los fermentadores alimentados con dietas a base de heno de alfalfa, en comparación con los valores derivados del consumo de dietas a basadas en hoja de olivo. Con las primeras, las producciones diarias son del mismo orden que los valores encontrados por BAS *et al.* (1989) y por MANSFIELD *et al.* (1994) y superiores a los obtenidos por CARRO y MILLER (1999b). Las eficiencias de producción, calculadas como g de nitrógeno aminoacídico de BAS/Kg CHOD, obtenidas con las dietas a base de heno de alfalfa son del mismo orden que los valores encontrados por MERRY *et al.* (1990) y muy superiores a los referidos por CARRO y MILLER (1999b). La suplementación de la hoja de olivo con habas y cebada provoca un aumento de la producción diaria de nitrógeno total y aminoacídico bacteriano así como de las eficiencias de producción. Con esta aproximación, también se observa que la adición de PEG tiene el efecto ya comentado con los resultados derivados de la estimación a partir del DAPA.

5.7. POTENCIAL DE LAS TÉCNICAS DE SIMULACIÓN PARA ESTIMAR LOS RESULTADOS *IN VIVO*.

El estudio *in vivo* del metabolismo del rumen y de los aspectos relativos a su microbiota es muy complicado, debido a que estos métodos requieren un elevado número de animales canulados en el rumen. A este problema se le añaden factores como la absorción a través del rumen, las distintas velocidades de paso de los alimentos, la medida de la producción de los gases y nutrientes, etc, que dificultan la estimación de los parámetros de fermentación ruminal *in vivo*. La aplicación de sistemas de simulación *in vitro* podría ser de gran utilidad para el estudio de la actividad de los microorganismos ruminales. En las últimas décadas, se ha intensificado el interés por la búsqueda de alternativas a los estudios *in vivo*, haciendo, para ello, comparaciones *in vivo-in vitro* para poder dilucidar la capacidad potencial que tienen las técnicas de simulación para estimar los resultados *in vivo* (MANSFIELD et al., 1995; GIZZI et al., 1998; TEJIDO et al., 2002).

En el presente trabajo se han obtenido diferentes ecuaciones de correlación lineal, entre los resultados obtenidos en los fermentadores y los de ensayos *in vivo* realizados en nuestro grupo con animales que recibían las mismas dietas que las ensayadas aquí (YÁÑEZ RUIZ, 2003).

Para la degradabilidad de la materia seca y del nitrógeno las ecuaciones de correlación lineal establecidas con todos los parámetros del perfil de degradación de las dietas de mediana-buena calidad eran significativas ($P < 0,001$) y positivas ($r = 0,71718$), salvo para DP y para c de la PB. GIZZI et al. (1998), tampoco, observaron diferencias entre los resultados de degradabilidad obtenidos *in situ* y en fermentadores. Sin embargo, para los alimentos de mala calidad (hoja de olivo), ninguna ecuación de correlación resultó significativa ($P > 0,05$). Esto podría indicar, que para los alimentos de mediana-buena calidad, los fermentadores de flujo continuo podrían constituir un medio adecuado para la determinación de su degradabilidad. Sin embargo, para los alimentos de mala calidad, el sistema de simulación *in vitro* no parece proporcionar un medio para estimar su degradabilidad, de manera razonablemente adecuada requiriéndose una más amplia investigación con este tipo de alimentos. Las ecuaciones de correlación obtenidas utilizando conjuntamente los resultados *in situ*, *in vitro* obtenidos con todas las dietas experimentales resultan significativas ($P < 0,001$) y positivas ($r = 0,74695$) salvo para el valor c de la PB. En este caso, los fermentadores simulan la degradabilidad que ocurre en el rumen entre 57 y 95%.

En cuanto a la concentración de nitrógeno amoniacal en los efluentes y en el contenido ruminal, las ecuaciones de correlación resultantes eran significativas ($P < 0,01$) y positivas (r

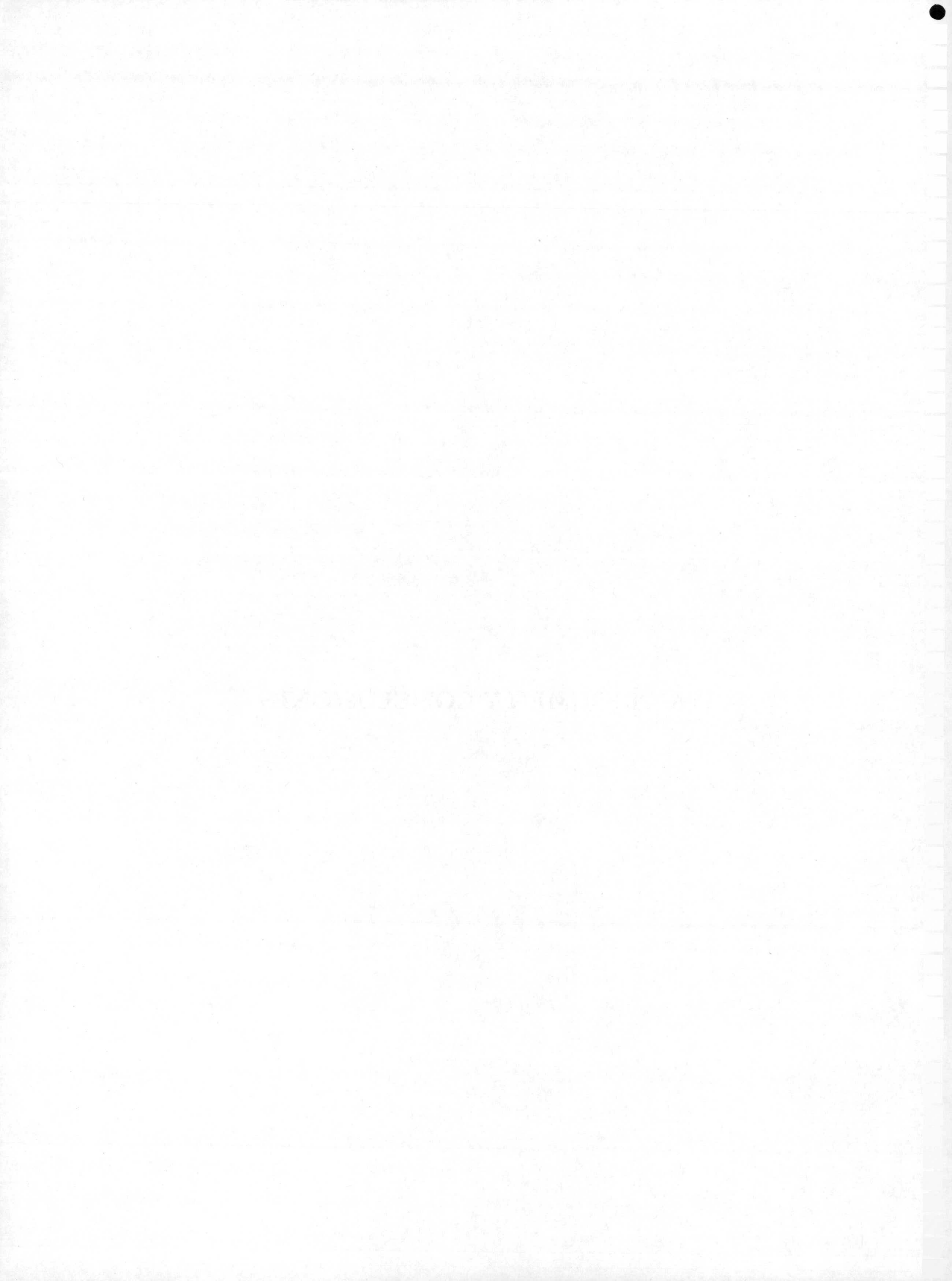
= 0,5732) sólo para las dietas de mediana-buena calidad (HA, HACO, HACOP y HOSUP). Sin embargo, esta ecuación indica que el sistema *in vitro* simula solo un 57% de lo que ocurre en el rumen. En fermentadores, las concentraciones de N-NH₃ son el resultado de la utilización y la liberación del mismo por la población microbiana. La ausencia de absorción en el sistema de simulación *in vitro* y las posibles diferencias en el reciclado del nitrógeno, hacen de este parámetro un mal indicador comparativo entre la actividad proteolítica y de la degradación de la proteína en los dos sistema *in vitro* e *in vivo*.

Para las concentraciones de AGV totales, las ecuaciones de correlación entre los resultados *in vivo* e *in vitro*, no eran significativas ($P = 0,054$) con las dietas de mediana-buena calidad (HA, HACO, HACOP y HOSUP), con un coeficiente de correlación muy bajo ($r = 0,38146$). Esto podría deberse a que los AGV totales no son absorbidos en el fermentador. Sin embargo, para la dieta de mala calidad (HO), la ecuación de correlación era significativa ($P < 0,05$), con un coeficiente de correlación elevado y positivo ($r = 0,9009$). Esto podría deberse a que con este tipo de alimento, las concentraciones de AGV no cambian a lo largo del día, como ha mostrado YÁÑEZ RUIZ (2003), en animales alimentados con hoja de olivo y que, por tanto, no se produce acumulo de estos productos en los fermentadores. Si se tienen en cuenta de manera conjunta, los resultados obtenidos para todas las dietas experimentales, las ecuaciones de correlación entre la concentración de AGV totales *in vivo* y en los fermentadores, resultan significativas ($P < 0,001$), con un coeficiente de correlación relativamente elevado ($r = 0,7717$). En este caso, los fermentadores simulan un 77% de lo que ocurría en el rumen del animal.

Para la producción de nitrógeno bacteriano, las ecuaciones de correlación entre los resultados *in vivo* e *in vitro* son significativas ($P < 0,05$), si se consideran conjuntamente todas las dietas experimentales (HA, HACO, HACOP, HO y HOSUP), con un coeficiente de correlación positivo pero muy bajo ($r = 0,4374$).

Para las dietas de mediana buena calidad, los fermentadores constituyen un modelo excelente para simular los resultados *in vivo* y para los alimentos de mala calidad se requiere de más investigación.

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES



6. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se estudia la composición, tanto en nutrientes como en factores no nutritivos del orujo de dos fases, extractado, desecado y parcialmente deshuesado y de la hoja de olivo procedente de la limpieza de la aceituna en almazara. Así mismo se estudia la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen de ovino y caprino de esos subproductos en su estado original y sometidos a distintos tratamientos.

Paralelamente, se ha llevado a cabo una serie de ensayos con fermentadores de flujo continuo, inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino y alimentados con dietas que incluían los subproductos mencionados. Se ha determinado la degradabilidad de la materia seca y de la proteína bruta de estas dietas y de sus ingredientes, las características cualitativas y cuantitativas de los productos de la fermentación promovida por las dietas experimentales. A partir del contenido del fermentador se obtuvieron las muestras bacterianas de referencia, discriminando por filtración y centrifugación diferencial las bacterias asociadas a la fase líquida (BAL) y las bacterias asociadas a la fase sólida (BAS). Además, se ha obtenido un extracto bacteriano de los efluentes (BE).

Se ha estimado la cantidad de proteína bacteriana producida en el fermentador, mediante la utilización de dos marcadores microbianos internos: ácido diaminopimélico y bases púricas.

El orujo de dos fases y la hoja de olivo son alimentos lignocelulósicos, con un bajo contenido en nitrógeno proteico (1,58 y 1,26 g/100 g MS para el orujo y la hoja, respectivamente) que está, en gran medida, ligado a la FAD (47,0 y 45,0 g/100 g Nt para el orujo y la hoja, respectivamente). La cantidad de TCT es de 37,3 y 11,1 mg/g MS en el orujo y la hoja, respectivamente.

La digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en rumen de la hoja de olivo no se ve afectada por el calentamiento a 60 °C; sin embargo, sí mejora la digestibilidad total de la proteína bruta. La prolongación del tiempo de incubación de estos alimentos en el rumen de 16 a 48 horas mejora la disponibilidad total de la proteína.

La degradabilidad de la fracción nitrogenada de las dietas experimentales y de sus ingredientes es muy similar en los fermentadores inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. La adición de PEG a la dieta que contenía orujo aumentaba la fracción potencialmente degradable (*b*) y disminuía la fracción rápidamente degradable (*a*) del concentrado elaborado con orujo, cebada y una mezcla minero-vitamínica y de la dieta que incluía heno de alfalfa y el mencionado concentrado (HACO). La velocidad de degradación

(c) del concentrado y de la dieta HACO aumentaba también considerablemente con la adición de PEG.

La sustitución de parte del heno de alfalfa por el concentrado provocó un aumento no muy pronunciado de la producción de nutrientes en los fermentadores inoculados con líquido ruminal de ovino o de caprino. La concentración molar de ácido acético en los efluentes disminuía y la de propiónico aumentaba, pero la proporción molar del primero sigue siendo muy alta, lo que indica que la actividad celulolítica es predominante cuando se suministran este tipo de dietas. La adición de PEG aumentaba la producción de nutrientes y de AGV. Las concentraciones medias de AGV totales e individuales, en los fermentadores alimentados con dietas a base de heno de alfalfa, son muy similares cuando el inóculo ruminal procede de ovino o de caprino. La producción de amonio y de AGV, a partir de la fermentación de hoja de olivo, es muy baja. La suplementación de este alimento con habas y cebada aumentó la producción de nutrientes, de amonio y de AGV.

Los protozoos desaparecen de los fermentadores a los 7 días del comienzo de los ensayos, lo que explicaría las diferencias más obvias entre el rumen y el fermentador.

Las bacterias aisladas de la fase líquida (BAL) y las asociadas a la fase sólida (BAS) de los fermentadores presentaron notables diferencias en lo que se refiere a su contenido en N-DAPA bases púricas así como a las relaciones DAPA/N y BP/N.

La cantidad de proteína bacteriana determinada utilizando marcadores microbianos internos (DAPA y BP), es muy superior en los fermentadores a los que se suministraban las dietas a base de heno de alfalfa que en aquellos que recibían las dietas que incluían hoja de olivo. La sustitución de parte de heno de alfalfa por concentrado que contiene orujo aumenta la producción de proteína bacteriana, con respecto a la dieta que solo contenía heno de alfalfa. La adición de PEG a los fermentadores alimentados con la dieta que contenía orujo, aumentó la producción de nitrógeno bacteriano en aquellos inoculados con líquido ruminal de ovino. En los inoculados con líquido ruminal de caprino, no se observó ningún efecto del suministro de PEG.

Las ecuaciones de correlación, establecidas entre los resultados obtenidos *in vivo* por YÁÑEZ RUIZ (2003) e *in vitro* en el presente trabajo, muestran un mayor potencial de las técnicas de simulación para predecir los resultados *in vivo* en cuanto a la degradabilidad de los alimentos de mediana-buena calidad, la concentración de amonio producida con las dietas de mediana-buena calidad así como a las proporciones molares de AGV totales y la síntesis de proteína microbiana de todas las dietas ensayadas en este trabajo.

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

1. La fermentación ruminal de una dieta que incluye heno de alfalfa y un concentrado, elaborado con orujo de dos fases, son muy similares, correspondiendo a una dieta de media calidad. Los productos obtenidos de la fermentación de la hoja de olivo son cuantitativamente escasos, pero su producción aumenta ostensiblemente si se suplementan adecuadamente con carbohidratos y proteína de una elevada degradabilidad ruminal.
2. La utilización del DAPA y de las bases púricas como marcadores microbianos conduce a valores de síntesis de proteína microbiana muy similares, aunque el último sobrestima, en algunos casos, como consecuencia del flujo de bases púricas no degradadas del alimento.
3. Las distintas fracciones bacterianas, aisladas tanto de los contenidos de los fermentadores (BAL y BAS) como de sus efluentes (BE), difieren en su composición química y en el contenido en DAPA y BP y en las relaciones DAPA/N y BP/N. Esto ha de tenerse en cuenta a la hora de emplear esas fracciones microbianas como muestra representativa de la microbiota ruminal total. Así mismo, la composición química de las muestras bacterianas aisladas (BAL, BAS, BE) se ve afectada por la dieta experimental suministrada al fermentador.
4. La fermentación ruminal, derivada del uso de inóculo ruminal de ovino o de caprino, ha sido muy similar. El efecto de la presencia de factores no nutritivos de tipo tanino en el orujo de dos fases ha sido evidenciado por el tratamiento con PEG, siendo más patente ese efecto en el caso de ovino.
5. La capacidad, en cuanto a la estimación de los productos de la fermentación ruminal, de los fermentadores de flujo continuo es -en términos comparativos- buena para los alimentos de media-buena calidad y no significativa para la hoja de olivo, aunque varía en función del parámetro a considerar.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA.

- AAFJES J.H., NIJHOF J.K. 1967. A simple artificial rumen giving good production of volatile fatty acids. *British Veterinary Journal*. 123: 436-445.
- ABDELGADIR I.E.O., COCHRAN R.C., TITGEMEYER E.C., VANZANT E.S. 1997. *In vitro* determination of ruminal protein degradability of alfalfa and prairie hay via a commercial protease in the presence or absence of cellulase or driselase. *Journal of Animal Science*. 75: 2215-2222.
- ABE M., IRIKI T. 1978. Effects of diet on the protozoa population in permeable continuous cultures of the rumen contents. *British Journal of Nutrition*. 39: 255-
- ABE M., IRIKI T. 1989. Mechanism whereby Holotrich ciliates are retained in the reticulo-rumen of cattle. *British Journal of Nutrition*. 62: 579-587.
- ABE M., IRIKI T., TOBE N., SHIBUI H. 1981. Sequestration of Holotrich Protozoa in the Reticule-Rumen of Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. 41: 758-765.
- AERTS R.J., BARRY T.N., MCNABB W.C. 1999. Polyphenols and agriculture: Beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 75: 1-12.
- AFRC, AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL. 1992. Nutritive Requirements of Ruminant Animals: Protein. Technical Committee on Responses to Nutrients. Report No.9. *Nutrition Abstracts Reviews*. (series B). 62:787-835.
- AFRC, AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL. 1992. Technical Committee on Responses to Nutrients: report no. 9. *Nutrition Abstracts and Reviews*, Series B. 62: 787-835.
- AFRC, AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL. 1998. *The Nutrition of Goats*. Technical Committee on Responses to Nutrients. Report no. 10. CAB International, Wallingford, Oxon OX10 DE, UK.
- AGUILERA J.F., GARCÍA M.A., MOLINA E. 1992. The performance of ewes offered concentrates containing olive by-products in late pregnancy and lactation. *Animal Production*. 55: 219-226.
- AGUILERA J.F., MOLINA E. 1986. Valorisation nutritive d'un grignon d'olive traité á la soude. *Annales de Zootechnie*. 35: 205-218.
- AGUILERA J.F., MOLINA E., PRIETO C., BOZA J. 1986. Estimación de las necesidades energéticas de mantenimiento en ganado ovino de raza Segureña. *Archivos de Zootecnia*. 35: 89-96.

- AGUILERA J.F., PRIETO C. 1986. Description and function of an open-circuit respiration plant for pigs and small ruminants and the techniques used to measure energy metabolism. *Archives of Animal Nutrition*. 36: 1009-1018.
- AGUILERA J.F., PRIETO C. 1991. Methane production in goats given diets based on lucerne hay and barley. *Archives of Animal Nutrition*. 41: 77-82.
- AGUILERA J.F., PRIETO C., FONOLLÁ J. 1990. Protein and energy metabolism of lactating Granadina goats. *British Journal of Nutrition*. 63: 165-175.
- AGUILERA J.F., PRIETO C., MOLINA E., LACHICA M. 1988. A micromethod for routine determination of chromic oxide in nutrition studies. *Analisis*. 16: 454-457.
- AHARONI Y., GILBOA N., SILANIKOVE N. 1998. Models of suppressive effect of tannins. Analysis of the suppressive effect of tannins on ruminal degradation by compartmental models. *Animal Feed Science and Technology*. 71: 251-267.
- AHARONI Y., TAGARI H. 1991. A new approach to the quantitative estimation of nitrogen metabolic path ways in the rumen. *British Journal of Nutrition*. 66: 407-422.
- AHN J.H., ROBERTSON B.M, ELLIOTT R., GUTTERIDGE R.C., FORD C.W. 1989. Quality assessment of tropical browse legumes: tannin content and protein degradation. *Animal Feed Science and Technology*. 27: 147-156.
- AHN J.H., ROBERTSON B.M., ELLIOT R., GUTTERIDGE R.C., FORD C.W. 1989. Quality assessment of tropical browse legumes: Tannin content and protein degradation. *Animal Feed Science and Technology*. 27: 147-156.
- AHN J.M. 1990. Quality assessment of tropical browse legumes. Tannin content and nitrogen degradability. *Ph. D. Thesis*. University of Queensland, Australia.
- AKIN D.E., RIGSBY L.L., THEODOROU M.K., HARTLEY R.D. 1988. Population changes of fibrolytic rumen bacteria in the presence of phenolic acids and plant extracts. *Animal Feed Science and Technology*. 19: 261-275.
- ALAM M.R., LAWSON G.D., POPPI D.P., SYKES A.R. 1987. Comparison of the site extent of digestion of nutrients of a forage in kids and lambs. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. 109: 583-589.
- ALAM M.R., POPPI D.P., SYKES A.R. 1983. Intake, digestibility and retention time of 2 forages by kids and lambs. *Proceeding of the New Zealand Society of Animal Production*. 43: 119-121.

- ALIBÉS X., MUÑOZ F., FACI R., PÉREZ-LANZAC J., GONZÁLEZ A. 1982. Valor alimenticio para rumiantes de la hoja de olivo seca. *XX Reunión Científica de la SINA*. Zaragoza. p. 15.
- ALLISON M.J. 1970. Nitrogen metabolism of ruminal microorganisms. En: *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant* (Ed: A. T. Phillipson). Oriel Press Ltd., England.
- ALLISON M.J. 1980. Nitrogen requirements of rumen microbial. En: *Proc. Int. Symp. Protein Requirements for Cattle* (Ed. F.N. Owens), Oklahoma State University, Stillwater, USA. 128-135.
- ALLISON M.J., ROBINSON I.M., DOUGHERTY R.W., BUCKLIN J.A. 1975. Grain overload in cattle and sheep: change in microbial populations in the caecum and rumen. *American Journal of Veterinary Research*. 36: 181-5.
- 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.
- ANNISON E.F. 1975. Microbial protein synthesis in relation to amino acid requirements. P. 141. *Tracer Studies on Nonprotein Nitrogen for Ruminants II*. FAO/IAEA.
- ANON. 1983. Presencia histórica del aceite de oliva. En: *Las Raíces del Aceite de Oliva*. Ministerio de Agricultura, Servicio de Publicaciones Agrarias, Madrid.
- ANTONIEWICZ A.M., KOSMALA I. 1995. Predicting ruminal degradability of lucerne and grass forage protein from *in vitro* solubility with non-specific bacterial protease or pancreatic. *Journal of Animal and Feed Science*. 4: 341-350.
- ANTONIEWICZ A.M., VUUREN A.M. VAN, KOELEN, C.J. VANDER, KOSMALA I. 1992. Intestinal digestibility of rumen undegraded protein of formaldehyde-treated foods measured by mobile bag and *in vitro* technique. *Animal Feed Science and Technology*. 39: 111-124.
- ANTONIOU T., HADJIPANAYIOTOU M. 1985. The digestibility by sheep and goats of five roughages offered alone or with concentrates. *Journal of Agricultural Science*. 105: 663-671.
- AOAC. 1984. Official methods of analysis, 14th edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.
- ARAMBEL M.J., BARTLEY E.E., DUFVA G.S., NAGARAJA T.G., DAYTON A.D. 1982. Effect of diet on amino and nucleic acids of rumen bacteria and protozoa. *Journal of Dairy Science*. 65: 2095-2101.

- ARC, AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL. 1984. *The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock Supplement No.1*. Report of the Protein Group of the ARC Working Party. Farnham Royal: CAB. Slough, 45 pp.
- 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 and Technology*. 58: 267-282.
- ASSOUMANI M.B.F., VEDEAU F., JACQUOT L., SNIFFEN C.J. 1992. Refinement of an enzymatic method for estimating the theoretical degradability of proteins in feedstuffs for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 39: 357-368.
- ATASOGLU C., VALDÉS C., NEWBOLD C.J., WALLACE. 1999. Influence of peptides and aminoacids on fermentation rate and de novo synthesis of aminoacids by mixed microorganisms from the sheep rumen. *British Journal of Nutrition*. 81: 307-314.
- ATASOGLU C., VALDÉS C., WALKER N.D., NEWBOLD C.J., WALLACE. 1998. De novo synthesis of amino acids on by the ruminal bacteria, *Prevotella bryantii* B14, *Selenomonas ruminantium* HD4, and *Streptococcus bovis* ES1. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 2836-2843.
- AUFRÈRE J., GRAVIOU D., DEMARQUILLY C., VERITÉ R., MICHALET DOREAU B., CHAPOUTOT P. 1991. Predicting *in situ* degradability of feed proteins in the rumen by two laboratory methods (solubility and enzymatic degradation). *Animal Feed Science and Technology*. 33, 97-116.
- BABA A.S.H., CASTRO F.B., ØRSKOV E.R. 2002. Partitioning of energy and degradability of browse plants in vitro and the implications of blocking the effects of tannins by the addition of polyethylene glycol. *Animal Feed Science and Technology*. 95: 93-104.
- 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.
- BAE H.D. MCALLISTER T.A., YANKE J., CHENG K.J., MUIR A.D. 1993. Effect of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 2131-2138.
- BAILY R.W., CLARKE R.T.J., WRIGHT D.E. 1962. Carbohidrases of the rumen ciliate *Epidinium ecaudatum* (Crawley). Action on plant hemicellulose. *Biochemical Journal*. 83: 517-

- BALCELLS J., GUADA J.A., CASTRILLO C. GASA J. 1993b. Rumen digestion and urinary excretion of purine derivatives in responses to urea supplementation of sodium-treated straw fed to sheep. *British Journal of Nutrition*. 69:721-732.
- BALCELLS J., GUADA J.A., PEIRÓ J.M., PARKER D.S. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxipurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 572: 153-157.
- BARRIOS URDANETA A., FONDEVILA M., BALCELLS J., DAPOZA C., CASTRILLO C. 2000. *In vitro* microbial digestion of straw cell wall polysaccharides in response to supplementation with different sources of carbohydrates. *Australian Journal of Agricultural Research*. 51: 393-399.
- BARRY T.N., DUNCAN S.J. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 1. Voluntary intake. *British Journal of Nutrition*. 51: 485-491.
- BARRY T.N., MANLEY T.R. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *lotus pedunculatus* for quantitative digestion of carbohydrates and protein. *British Journal of Nutrition*. 51: 493-504.
- BARRY T.N., MANLEY T.R. 1986. Interrelationships between the concentrations of total condensed tannin, free condensed tannin and lignin in *Lotus spp.*, their possible consequences in ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 37: 248-254.
- BAS F.J., STERN M.D., FAHEY G.C.JR. 1989a. Alkaline hydrogen peroxide-treated wheat straw as a source of energy for ruminal bacteria in continuous culture. *Journal of Animal Science*. 67: 2081-2088.
- BAS F.J., STERN M.D., FAHEY G.C.JR. 1989a. Alkaline hydrogen peroxide-treated wheat straw as a source of energy for ruminal bacteria in continuous culture. *Journal of Animal Science*. 67: 2081-2088.
- BAS F.J., STERN M.D., FAHEY J.R. 1990. Effects of various combinations of urea, soya-bean meal and maize in alkaline hydrogen peroxide-treated wheat straw-based diets on ruminal bacterial fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 29: 101-112.
- BATES D.B., GILLET J.A., BARAO S.A., BERGER W.G. 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.
- BATTACHARYA A.N. 1980. Research on goat nutrition and management in Mediterranean Middle East and adjacent countries. *Journal of Dairy Science*. 63: 1681-

- BAUCHART D., LEGALY-CARMIER F., DOREAU M., JOUANY P. Effects de l'addition de matières grasses non protégées à la ration de la vache laitière sur la concentration et la composition chimique des bactéries et des protozoaires du rumen. *Reproduction Nutrition Development*. 26: 309-310.
- BAUCHOP T. 1979a. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. *Applied and Environmental Microbiology*. 38: 148-158.
- BAUCHOP T. 1979b. The Rumen anaerobic fungi: colonizers of plant fibre. *Annales de Recherches Veterinaires*. 10: 246-248.
- BECKERS Y., THEWIS A., MAUDOÛX B., FRANCOIS E. 1995. Studies on the in situ nitrogen degradability corrected for bacterial contamination of concentrate feeds in streets. *Journal of Animal Science*. 73: 220-227.
- BEEVER D.E. 1993. Rumen function. En: *Quantitative aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. Ed: J.M. Forbes, J. France. CAB International, pp: 187-215.
- BELL T.A., ETCHELLS J.L., SINGLETON J.A., SMART JR., W.W.G. 1965. Inhibition of pectinolytic and cellulolytic enzymes in cucumber fermentation by *Sericea*. *Journal of Food Science*. 30: 233-239.
- BEN DHIA M., KHALIDI G., MAJDOUB A. 1981. Utilisation des sous-produits de l'olivier dans l'alimentation animale. Travaux réalisés en Tunisie. *Seminaire International sur la valorisation des sous-produits de l'olivier*. FAO. Monastir Tunisie. 57-64.
- BEN DHIA M., MAJDOUB A. 1981. Possibilité de valorisation des sous-produits de l'oléiculture dans l'alimentation animale. *Document Technique. INRA*. N° 43.
- BEN SALEM H., NEFZAOUI A., BEN SALEM L., TISSERAND J.L. 1999a. 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., NEFZAOUI A., BEN SALEM L., TISSERAND J.L. 1999b. Different means of administering polyethylene glycol to sheep: effect of nutritive value of *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage. *Animal Science*. 68: 809-818.
- BEN SALEM H., NEFZAOUI A., BEN SALEM L., TISSERAND J.L. 2000. Deactivation of condensed tannins in *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage by polyethylene glycol in feed blocks. Effect on feed intake, diet digestibility, nitrogen balance, microbial synthesis and growth by sheep. *Livestock Production Science*. 64: 51-60.

- BINES J.A., DAVEY A.W.F. 1970. Voluntary intake, digestion, rate of passage, amount of material in the alimentary tract and behavior in cows receiving complete diets containing straw and concentrates in different proportions. *British Journal of Nutrition*. 24: 1013-1024.
- BLAKE W.L., STERN M.D. 1988. Influence of protein source on amino acid profile of effluent flowing from continuous culture of ruminal contents *Journal of Animal Science*. 66: 2284-2298.
- BLANCHART G., DURAND M., BARRY J.L., BOUILLER-LOUDOT M., JOUANY J.P. 1989. Intérêts et limites des fermenteurs à flux semi-continu de type Rusitec dans l'étude des fermentations du rumen. *Annales de Zootechnie*. 38: 285-314.
- BLANCHART G., VIGNON B. 1984. Adaptation d'un fermenteur de type Rusitec. *Cahiers de Technologie*. INRA. 9: 1-10.
- BLANCHART G., VIGNON B. 1990. Explication et provision des cinétiques de dégradation en Rusitec des matières azotées végétales à partir d'un fractionnement des parois. *Reproduction, Nutrition, Development*. 25: 493-505.
- BOCHI-BRUM O., CARRO M.D., VALDES C., GONZALEZ J.S., LOPEZ S. 1999. Digestibilidad in vitro de forrajes y concentrados: efecto de la ración de los animales donantes de líquido ruminal. *Archivos de Zootecnia*. 48: 51-61.
- BOND D.A. 1976. In vitro digestibility of the testa in tannin-free field beans (*Vicia faba* L.). *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. 86: 561-566.
- BONHOMME A. 1990. Rumen ciliates: their metabolism and relationships with bacteria and their host. *Animal Feed Science and Technology*. 30: 203-266.
- BOUILLER-LOUDOT M., BELFADLA A., CANDAU M. 1988a. Influence de l'addition de vitamines du groupe B sur la dégradation des constituants pariétaux (paille, foin, pulpe) par les microorganismes du rumen en fermenteur semi-continu. *Reproduction, Nutrition, Development*. 28: 171-172.
- BOUILLER-LOUDOT M., BELFADLA A., TAHAR J., CANDAU M. 1988b. Influence de l'addition de vitamines hydrosolubles sur la dégradation des substrats riches en constituants pariétaux par les microorganismes du rumen en fermenteur semi-continu. (soumis à publication).
- BOZA J., FONOLLÁ J., AGUILERA J.F. 1970. Aprovechamiento de subproductos agrícolas-industriales en la alimentación del ganado ovino. I. Estudio de la digestibilidad de dietas a base de orujo de aceituna y melazas de remolacha. *Revista de Nutrición Animal*. 8: 13-16.

- BOZA J., GUERRERO J.E. 1981. Valeur alimentaire des quelques sous-produits agricoles pour la chèvre. En: *Nutrition et Systèmes d'Alimentation de la chèvre*. (Eds: Morand Ferh P., Bourbouze A., Simiane M.), ITOVIC-INRA. Tours. France, Vol. II, pp. 635-642.
- BOZA J., VARELA G. 1960. Experiencias de digestibilidad en cerdos retintos de tipo ibérico. *Anales de Edafología y Agrobiología*. 20: 337-365.
- BRANDT M., ROHR K., LEBZIEN P. 1980. Bestimmung des endogenen protein-N in duodenalchymus von milchkühen mit hilfe von ^{15}N . *Zeitschrift Tierphysiologie Tierernähr. Futtermittelkd.* 44:26-27.
- BRICE R.E., MORRISON L.M. 1983. Digestion of grass stem in nylon bags of different pore size in an artificial rumen (Rusitec). *Proceedings of the Nutrition Society*. 42: 30A.
- BRODERICK G.A., ALBRECHT K.A. 1997. Ruminal *in vitro* degradation of protein in tannin-free and tannin-containing forage legume species. *Crop Sci.* 37: 1884-1891.
- BRODERICK G.A., MERCHEN N.R. 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis by rumen microbes. *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 of Applied Microbiology*. 18: 313-318.
- BROOKER J.D., O'DONOVAN L., SKENE I., SELICK G. 2000. Mechanisms of tannin resistance and detoxification in the rumen. En: *Tannins in livestock and human nutrition*. (Ed. J.D. Brooker). ACIAR Proceedings No.92. Australia. pp. 117-122.
- BROUDISCOU L.P., PAPON Y., FABRE M., BROUDISCOU A.F. 1997b. Maintenance of rumen protozoa populations in a dual outflow continuous fermenter. *Journal of Science Food and Agriculture*. 75: 273-280.
- BRYANT J.P., REICHARDT P.B., CLAUSEN T.P. 1992. Chemically mediated interactions between woody plants and browsing mammals *Journal of Range Management*. 45: 18-24.
- BRYANT M.P. 1973. Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. *Feed Production*. 32: 1889-1913.
- BRYANT M.P. ROBINSON I.M., BOUMA C., CHU H. 1958. *Bacteroides ruminicola* n. sp. and the new genus and species *Succinimonas amylolytica*. Species of succinic-acid producing anaerobic bacteria of the bovine rumen. *Journal of Bacteriology*. 76: 15-23.
- BRYANT M.P., BURKEY L.A. 1953. Cultural methods and some characteristic of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *Journal of Dairy Science*. 36: 205-217.

- BRYANT M.P., ROBINSON I.M. 1962. Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria. *Journal of Bacteriology*. 82: 605-614.
- BRYANT M.P., ROBINSON I.M. 1968. Effects of diet, time after feeding and position sample on numbers of viable bacteria in the bovine rumen. *Journal of Dairy Science*. 51: 1950-1955.
- BUTTERY, P.J., COLE D.J.A. 1977. Methods for evaluating feeds for large farm animals. Chemical analysis: sources of error. *Proceeding of the Nutrition Society*. 36:211-218.
- CABRERA A., MARTIN A. 1986. Variation in tannin content in *Vicia faba* L. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. 106: 377-382.
- CABRERA R., VILLARROEL P., VIAL E., CASTILLO A. 1983. Rumen fermentative activity in the goat and sheep. *South African Journal of Animal Science*. 13: 213-215.
- CALSAMIGLIA S., FERRET A., SENSADA M., MIQUEL N, DOBLAS A. 1997. Ruminal degradation and intestinal digestion of protein supplements commonly fed to ruminants. *Journal of Dairy Science*. 80 (Suppl.1): 399 (Abstract).
- CALSAMIGLIA S., STERN M.D. 1995. A three-step *in vitro* procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. *Journal of Animal Science*. 73: 1459-1465.
- 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.
- CARRO M.D., LEBZIEN P., ROHR K. 1995. Effect of pore size of nylon bags and dilution rate on fermentation parameters in a semi-continuous artificial rumen. *Small Ruminant Research*. 15: 113-119.
- CARRO M.D., LÓPEZ S., VALDÉS C., GONZÁLEZ J.S. 1999. Effect of nitrogen form (casein and urea) on the *in vitro* degradation of cell walls from six forages. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 81: 212-222.
- CARRO M.D., MILLER E.L. 1999a. Comparison of ¹⁵N and purines and microbial markers in a *Rusitec* system. En: *Proceedings of the BSAS Winter Meeting 1999*, BSAS. pp.214.
- CARRO M.D., MILLER E.L. 1999b. Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semi-continuous culture system (RUSITEC). *British Journal of Nutrition*. 82: 149-157.

- CARRO M.D., MILLER E.L. 2002. Comparison of bacterial markers (^{15}N and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. *Animal Science*. 75: 315-321.
- 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 insolation techniques. *Journal of Dairy Science*. 73: 2480-2488.
- CISZUK P. 1992. Förslag til AAT- och PBV- norm för getter. Mimeograph. Institutiuionen för husdjurens utfodring och vård. *Sveriges lantbruksuniversitet*.
- CIVANTOS L. 1981. Aprovechamiento de ramones y leña en el olivar. *Agricultura*. 585: 180-181.
- CIVANTOS L. 1995. Evolución de la superficie del olivar y de las producciones de aceite de oliva en España. *Olivae*. 59: 18-21.
- CLAPPERTON J.L. 1964. The energy metabolism of sheep walking on the level and on gradients. *British Journal of Nutrition*. 18: 47-54.
- 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.
- COCKBURN J.E., WILLIAMS A.P. 1984. The simultaneous estimation of the amounts of protozoal, bacterial and dietary nitrogen entering the duodenum of steers. *British Journal of Nutrition*. 51: 111-132.
- COLE N.A., JOHNSON R.R., OWENS F.N. 1976. Influence of roughage level on the site and extent of digestion of whole shelled corn by beef steers. *Journal of Animal Science*. 43: 483-493.
- COLEMAN G.S. 1975. The interrelationships between rumen ciliate protozoa and bacteria. Page 149 En: *Digestion and Metabolism in the Ruminant*. (Eds: McDonald I.W., Warner A.C.I.). Univ. New England Publ. Unit, Armidale, New South Wales, Australia.
- COTTA M.A., HESPELL R.B. 1986. Protein and amino acid metabolism of rumen bacteria. En: *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*. (Eds: Milligan L.P., Grovum W.L., Dobson A.). Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, pp 122-136.
- CRAIG W.M., BRODERICK G.A., RICKER D.B. 1987b. Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal digesta. *Journal of Nutrition*. 117: 56-62.
- CRAIG W.N., BROWN D.R., BRODERICK G.A., RICKER D.B. 1987a. Post-pandrial composition changes fluid and particle-associated ruminal microorganisms. *Journal of Animal Science*. 65: 1042-1053.

- CRAWFORD R.J. JR., HOOVER W.H., KNOWLTON P.H. 1980a. 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., HOOVER W.H., JUNKINS L.L. 1980b. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. II. Nitrogen partition and efficiency of microbial synthesis. *Journal of Animal Science*. 51: 986-995.
- CRAWFORD R.J., SHRIVER B.J., VARGA G.A., HOOVER W.H. 1983. Buffer requirements for maintenance of pH during fermentation of individual feed in continuous cultures. *Journal of Dairy Science*. 66: 1881-1890.
- CRUZ SOTO R., MUHAMMED S.A., NEWBOLD C.J., STEWART C.S., WALLACE J. 1994. Influence of peptides, aminoacids and urea on microbial activity in the rumen of sheep receiving grass hay and on the growth of rumen bacteria *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. 49: 151-161.
- CSAPÓ J., HENICS Z. 1991. Quantitative determination of bacterial protein from the diaminopimelic acid and D-Alanine content of rumen liquor and intestines. *Acta Agronomica Hungarica*. 40: 159-173.
- CUBERO J.I., MORENO M.T. 1983. Leguminosas de grano. Ediciones Mundi-Prensa. Castelló, 37. Madrid-1.
- CUMMINS C.S. 1989. Bacterial cell wall structure. En: *Practical Handbook of Microbiology*, pp 349-379 (Ed: M.W. O' Leary). Boca Raton, FL: CRC Press Inc.
- CZERKAWSKI J. W. 1974. Methods for determining 2-6-diaminopimelic and 2-aminoethyphosphonic acid in gut contents. *Journal of Science Food and Agriculture*. 25: 45-55.
- CZERKAWSKI J.W. 1984. Microbial fermentation in the rumen. *Proceedings of the Nutrition Society*. 43: 101-118.
- CZERKAWSKI J.W. 1986. The artificial rumen. En: *Introduction to Rumen Studies*. Pergamon Press, Oxford, pp.51-62.
- CZERKAWSKI J.W., BRECKENRIDGE G. 1969b. Fermentation of various soluble carbohydrates by rumen microorganism with particular reference to methane production. *British Journal of Nutrition*. 23: 925-937.
- CZERKAWSKI J.W., BRECKENRIDGE G. 1969a. The fermentation of sugar-beet pulp and sucrose in an artificial rumen, and the effect of linseed oil fatty acids on the fermentation. *British Journal of Nutrition*. 23: 51-66.

- CZERKAWSKI J.W., BRECKENRIDGE G. 1970. Small scale apparatus for studying rumen fermentation *in vitro*. *Laboratory Practice*. 19: 717-19.
- CZERKAWSKI J.W., BRECKENRIDGE G. 1975. New inhibitors of methane production by rumen microorganisms. Experiments with animal and other practical possibilities. *British Journal of Nutrition*. 34: 446-457.
- 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., BRECKENRIDGE G. 1979. Experiments with the long-term rumen simulation technique (RUSITEC): use of soluble food and an inert solid matrix. *British Journal of Nutrition*. 42: 229-245.
- CZERKAWSKI J.W., BRECKENRIDGE G. 1985. Metabolism of protein supplements studied by the rumen simulation technique (Rusitec). *Arch fur Tierernahrung*. 35: 261-277.
- CZERKAWSKI J.W., CHENG K.J. 1988. Compartmentation in the rumen. En: *The Rumen Microbial Ecosystem*. (Ed: P.N. Hobson). Elsevier Applied Science. Pp: 361-385.
- CHALUPA W. 1976. Degradation of amino acids by the mixed rumen microbial population. *Journal of Animal Science*. 43: 828-834.
- CHAMBERLAIN D.G., THOMAS P.C. 1979. Ruminal nitrogen metabolism and the passage of amino acids to the duodenum in sheep receiving diets containing hay and concentrates in various proportions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 30: 677.
- CHEN G., RUSSEL J.B., SNIFFEN C. J. 1987. A procedure for measuring peptides in rumen fluid and evidence that peptide uptake can be rate-limiting step in ruminal protein degradation. *Journal of Dairy Science*. 70: 1211-1219.
- CHENG K.J., JONES G.A., SIMPSON F.J., BRYANT M.P. 1969. Isolation and identification of rumen bacteria capable of anaerobic rutin degradation. *Canadian Journal of Microbiology*. 15: 1365-1371.
- CHESTER JONES H., STERN M.D., SU A., DONKER J.D., ZIEGLER D.M., MILLER K.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: 2954-2964.
- 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.

- CHIKUNYA S., NEWBOLD C.J., RODE L., CHEN X.B., WALLACE R.J. 1996. Influence of dietary rumen-degradable protein on bacterial growth in the rumen of sheep receiving different energy sources. *Animal Feed Science and Technology*. 63: 333-340.
- CHIQUETTE J., CHENG K.J., COSTERTON J.W., MILLIGAN L.P. 1988. Effect of tannins on the digestibility of two isosynthetic strains of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus L.*) using *in vitro* and *in sacco* techniques. *Canadian Journal of Animal Science*. 68: 751-760.
- CHOW J.M., RUSSELL J.B. 1992. Effect of pH and monensin on glucose transport by *Fibrobacter succinogenes*, a cellulolytic ruminal bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 1115-1120.
- CHURCH D. 1976. Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants. En: *Digestive Physiology* (Ed: D.C. Church), Vol. I. Corvallis, OR.
- CHURCH D.C. 1988. Salivary function and production. En: *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*. (Ed: Church D.C.). Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, p117.
- DAVEY L.A., CHESSEMAN 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.
- DAVIS C.L. 1979. The use of buffers in the rations of lactating dairy cows. En: *Regulation of Acid-Base Balance* (Eds: W.H. Hale, P. Meinhardt). Church y Dwigh Co., Inc., Piscataway, NJ, pp51-64.
- 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.
- DEBOER G., MURPHY J.J., KENNELLY J.J. 1987. Mobile nylon bag for estimating intestinal availability of rumen undegradable protein. *Journal of Dairy Science*. 70: 977-982.
- 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* .pp.121-137.
- DEHORITY B.A., GRUBB J.A. 1980. Effect of short-term chilling of rumen contents on viable bacterial numbers. *Applied of Environment Microbiology*. 39: 376-381.
- DEHORITY B.A., ORPIN C.G. 1988. Development of, and Natural Fluctuations in, Rumen Microbial Populations. En: *The rumen Microbial Ecosystem*, (Ed: P.N. Hobson). pp: 151-183. Elsevier Applied Science. England. U.K.

- DEHORITY B.A., SCOTT H.W. 1967. Extent of cellulose and hemicellulose digestion in various forages by pure cultures of rumen bacteria. *Journal of Dairy Science*. 50: 1136-1141.
- DELGADO PERTÍÑEZ M., CHESSON A., PROVAN G.J., GARRIDO A., GÓMEZ CABRERA A. 1998. Effect of different drying systems for the storage of olive leaves on their nutritive value for ruminants. *Annales de Zootechnie*. 47: 141-150.
- DELGADO PERTÍÑEZ M. 1994. Valoración nutritiva de la hoja de olivo. Efecto de su origen y de los tratamientos de manipulación. *Tesis Doctoral*. Universidad de Córdoba. España. 241 pgs.
- DELGADO PERTÍÑEZ M., CHESSON A., GORDON J.P., GARRIDO A., GÓMEZ CABRERA A. 1998. Effect of different drying systems for the conservation of olive leaves on their nutritive value for ruminants. *Annales de Zootechnie*. 47: 141-150.
- DELGADO PERTÍÑEZ M., GÓMEZ CABRERA A., GARRIDO A. 2000. Predicting the nutritive value of the olive leaf (*Olea europaea*): digestibility and chemical composition and *in vitro* studies. *Animal Feed Science and Technology*. 87: 187-201.
- DELGADO PERTÍÑEZ M., GÓMEZ CABRERA A., GARRIDO A., GUERRERO J.E. 1994. La hoja de olivo: un subproducto por utilizar. *Mundo Ganadero*. 12: 44-48.
- DEMEYER D.I. 1981. Rumen microbes and digestion of plant cell walls. *Agricultural Environment*. 6: 295-337.
- DENHOLM A.M., LING J.R. 1989. *In vitro* metabolism of 2,2'-diaminopimelic acid from Gram-positive and Gram-negative bacterial cells by ruminal protozoa and bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 212-218.
- DESHPANDE S.S., CHERYAN M., SALUNKE D.K. 1986. Tannin analysis of food products. *CRC. Cri. Review Food Science Nut*. 24: 401-449.
- DOIG A.J., WILLIAMS D.H., OELRICHS P.B., BACZYNSKY J.L. 1990. Isolation and structure elucidation of punicalagin a toxic hydrolysable tannin, from *Terminalia oblongata*. *Journal of Chemistry Society. Perkins Transaction*. I. 8: 2317-2321.
- DOMINGUE B.M.F., DELLOW D.W., BARRY T.N. 1991. Voluntary intake and rumen digestion of low-quality roughage by goats and sheep. *Journal of Agricultural Science*. 117: 111-120.
- DOREAU M., FERLAY A., EL MEDDAH Y. 1993. Organic matter and nitrogen digestion by dairy cows fed calcium salts of rapeseed oil fatty acids of rapeseed oil. *Journal of Animal Science*. 71: 499-504.

- DOREAU M., LEGAY F., BAUCHART D. 1991 Effect of source and level of supplemental fat on total and ruminal organic matter and nitrogen digestion in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 74: 2233-2242.
- DOYLE P.T., DOVE H., FREER M., HART F.J., DIXON R.M., EGAN A.R. 1988. Effects of a concentrate supplement on the intake and digestion of a low-quality forage by lambs. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. 111: 503-511.
- DUFVA G.S., BARTLEY E.E., ARAMBEL M.J., NAGARAJE T.G., DENNIS S.M., GALITZER S.G., DAYTON A.D. 1982. Diaminopimelic acid content of feeds and rumen bacteria its usefulness as a rumen bacterial marker. *Journal of Dairy Science*. 65: 1754-1759.
- DURAND M. 1989. Conditions for optimizing cellulolytic activity in the rumen. En: *Evaluation of Straw in Ruminant Feeding*. (Eds: M. Chesnot, P. Reiniger). Commission of Europeans Communities. Elsevier. pp. 3-19.
- DURAND M., BEAUMATIN PH., DUMAY C., MESCHY F., KOMISARCZUK S. 1986a. Influence de l'addition de phosphore sur la digestion d'une paille traitée à l'ammoniac par les microorganismes du rumen en fermenteur semi-continu (Rusitec). *Reproduction, Nutrition, Development*. 26: 297-298.
- DURAND M., HANNEQUART G., BEAUMATIN PH., DUMAY C. 1986b. Use of the rumen simulation technique (Rusitec) to study the effect of type of feedstuffs and mineral supply on microbial protein synthesis. *Archives of Animal Nutrition* (Berlin). 36: 327.
- DURAND M., HANNEQUART G., BEAUMATIN PH., DUMAY C., TASSERY F. 1986c. Influence du niveau d'apport de soufre sur la synthèse d'acide ribonucléique et de protéines par les microorganismes du rumen en fermenteur semi-continu. *Reproduction, Nutrition, Development*. 26: 299-300.
- Durand M., Komisarczuk S. 1988. Influence of major mineral on rumen microbiota. *J. Nutr.* 118: 249-260.
- DURAND M., STEVANI J., KOMISARCZUK S. 1987. Effect of some major minerals on rumen microbial metabolism in a semi-continuous fermentor (Rusitec). *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* 52: 1655-1663.
- DZOWELA B.H., HOVE L., TOPPS J.H., MAFONGOYA P.L. 1995. Nutritional and anti-nutritional characters and rumen degradability of dry matter and nitrogen for some multipurpose tree species with potential for agroforestry in Zimbabwe. *Animal Feed Science and Technology*. 55: 207-214.

- EADIE J.M., MANN S.O. 1970. Development of the rumen microbial population: high starch diets and instability. En: *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*. (Ed: Phillipson A.T.). Oriel Press, Newcastle-upon-Tyne, pp.335-347.
- EL HAG C.A. 1976. A comparative study between desert goat and sheep on efficiency of feed utilization. *World Review Animal Production*. 12: 43-48.
- ERFLE J.D., BOILA R.J., TEACHER R.M., MAHADEVAN S., SABER F.D. 1982. Effects of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms *in vitro*. *Journal of Dairy Science*. 65: 1457-1464.
- FAICHNEY G.J. 1975. The use of markers to partition digestion within the gastrointestinal tract of ruminants. En: *Digestion and Metabolism in the Ruminant*. (Eds: McDonald I. W., Warner A.C.I.) Universidad de Armidale of New England Publishing Unit. pp. 277-291.
- FAICHNEY G.J. 1986. The Kinetics of Particulate Matter in the Rumen: En: *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*. (Eds: L.P. Milligan, W.L. Grovum, A. Dobson). Reston, Va; US: Reston Publishing Co. pp 173-195.
- FAUSTO LUCHETTI. 2002. El mercado mundial del aceite de oliva. *Olivae*. 92: 22-24.
- FEGEROS K., ZERVAS G., APSOKARDOS F., VASTARDIS J., APOSTOLAKI E. 1995. Nutritive evaluation of ammonia treated olive tree leaves for lactating sheep. *Small Ruminant Research*. 17: 9-15.
- 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.
- FELLNER V., SAUER F.D., KRAMER J.K.G. 1997. Effect of nigericin, monensin, and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow through ruminal fermenters. *Journal of Dairy Science*. 80: 921-928.
- FENG P., HUNT C.W., PRITCHARD G.T., PARISH S.M. 1995. Effect barley variety and dietary barley content of digestive function in beef steers fed grass hay-based diets. *Journal of Animal Science*. 73: 3476-3484.
- FERLAY A., LEGAY F., BAUCHART D., PONCET C., DOREAU M. 1992 Effect of a supply of raw or extruded rapeseeds on digestion in dairy cows. *Journal of Animal Science*. 70: 915-923.
- FIELD J.A., LETTINGA G. 1992. Toxicity of tannic compounds to microorganisms: En: *Plant Polyphenols*. (Eds: Hemingway R.W., Laks P.E.), Plenum Press, New York. pp. 673-692.
- FIORINO P., NIZZI GRIFFI F. 1992. The spread of olive farming. *Olivae*. 44:9.

- FIRKINS J.L., BERGER L.L., MERCHEN N.R., FAHEY G.C.JR., MULVANEY R.L. 1987. Ruminal nitrogen metabolism in steers as affected by feed intake and dietary urea concentration. *Journal of Dairy Science*. 70: 2302-2311.
- FLETCHER M. 1983. The effects of methanol, ethanol, propanol, and butanol on bacterial attachment to surfaces. *Journal of General Microbiology*. 129: 633.
- FOLEY W.J., JASON G.R., MCARTHUR C. 1999. Role of secondary Metabolites in the nutritional ecology of mammalian herbivores: how far have we come in 25 years?. En: *Nutritional Ecology of Herbivores*. (Eds: H-J.G. Jung, G.C Fahey, Jr). American Society of Animal Science, Illinois (Estados Unidos). pp. 130-209.
- FONDEVILA M., BARRIOSURDANETA A., BALCELLS J., CASTRILLO C. 2002. Gas production from straw incubated in vitro with different levels of purified carbohydrates. *Animal Feed Science and Technology*. 101:1-15.
- FONDEVILA M., CASTRILLO C., GUADA J.A., BALCELLS J. 1994. Effect of ammonia treatment and carbohydrate supplementation of barley straw on rumen liquid characteristics and substrate degradation by sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 50: 137-155.
- FONTY G., BRETON A., FEVRE M., CITRON A., HEBRAUD M., GOUET PH. 1987. Isolement et caractérisation des champignons anaérobies stricts du rumen de moutons. *Reproduction, Nutrition, Development*. 27: 237-238.
- FONTY G., JOBLIN K.N. 1991. Rumen anaerobic fungi: Their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. En: *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants* (Eds: Tsuda T., Y.Sasaki, R. Kawashima).pp. 655-680. Academic Press, San Diego.
- FORSBERG C.W., LAM K. 1977. Use of adenosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen content. *Applied and Environmental Microbiology*. 33: 528-537.
- FORSBERG C.W., LAM K. 1977. Use of adenosine 5-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen contents. *Applied and Environmental Microbiology*. 33: 528-537.
- FRANCE J., SIDDON R.C. 1993. Volatile fatty acids production. En: *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. (Eds: J.M. Forbes, J. France). CAB International. Wallingford, UK., pp 107-121.

- FUCHIGAMI M., SENSU T., HORGUCHI M. 1989. A simple continuous culture system for rumen microbial digestion study and effects of defaunation and dilution rates. *Journal of Dairy Science*. 73: 3070-3078.
- FUJIMAKI T., KOBAYASHI M., WAKITA M., HOSHINO S. 1989. Influence of amino acid supplement on cellulolysis and microbial yield in sheep rumen. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 62: 119-124.
- GARCÍA M.A., ISAC M.D., AGUILERA J.F., MOLINA ALCAIDE E. 1994. Rumen fermentation pattern in goats and sheep grazing pastures from semiarid Spanish lands unsupplemented or supplemented with barley grain or barley grain-urea. *Livestock Production Science*. 39: 81-84.
- GETACHEW G., MAKKAR H.P.S., BECKER K. 2000. Effect of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. *British Journal of Nutrition*. 84: 73-83.
- GETACHEW G., MAKKAR H.P.S., BECKER K. 2001. Method of polyethylene glycol application to tannin-containing browses to improve microbial fermentation and efficiency of microbial protein synthesis from tannin-containing browses. *Animal Feed Science and Technology*. 92: 51-57.
- GIGER S., SAUVANT D., DURAND M., HERVIEU J. 1988. Influence de la nature de l'aliment concentré sur quelques paramètres de la digestion dans le rumen. *Reproduction, Nutrition, Development*. 28: 117-118.
- GILBOA N., PEREVOLOTSKY A., LANDAU S., NITSAN Z., SILANIKOVE N. 2000. Increasing productivity in goats grazing Mediterranean woodland and scrubland by supplementation of polyethylene glycol. *Small Ruminant Research*. 38: 183-190.
- GIZZI G., ZANCHI R., SCIARAFFIA F. 1998. Comparison of microbial and fermentation parameters obtained with and improved rumen *in vitro* those obtained *in vivo*. *Animal Feed Science and Technology*. 73: 291-305.
- GLOMBITZA K.W., GERSTBERGER G. 1985. Phlorotannins with dibenzodioxin structural elements from the brown alga *Eisenia arborea*. *Phytochemistry*. 24: 543-557.
- GOERING H.K., GORDON C.H., HEMKEN R.W., WALDO D.R., VAN SOEST P.J., SMITH L.W. 1972. Analytical estimates of nitrogen digestibility in heat damaged forages. *Journal of Dairy Science*. 54: 1275-1280.

- GÓMEZ CABRERA A., GARRIDO A., GUERRERO J.E., ORTIZ V. 1992. Nutritive value of the olive leaf: Effects of cultivar, season of harvesting and system of drying. *Journal of Agricultural Science*. 119: 205-210.
- GÓMEZ CABRERA A., PARELLADA J., GARRIDO A., OCAÑA F. 1982. Utilización del ramón de olivo en alimentación animal. II. Valor alimenticio. *Avances en Alimentación y Mejora Animal*. 23: 75-77.
- GOMEZ L., BOGAERT C., JOUANY J.P., LASSALAS B. 1991. The influence of lasalocid and cationmycin on nitrogen digestion in sheep: comparison of methods for estimating microbial nitrogen. *Canadian Journal of Animal Science*. 71: 389-399.
- GONZÁLEZ S., CARULLA J., PABSAN M. 1988. Effect of tannins on *in vitro* ruminal protein and dry matter degradation of soybean meal and ryegrass. *Journal of Animal Science*, 67, Suppl. 1., 346A / *Journal of Dairy Science*, 81, Suppl. 1, 346A.
- GOODCHILD A.V. 1989. Use of leguminous browse foliage to supplement low quality roughages for ruminants. *PhD. Thesis* University of Queensland, St. Lucia, Australia.
- GRANT R.J., MERTENS D.R. 1992. Influence of Buffer pH and raw corn starch addition on *in vitro* fibre digestion kinetics. *Journal of Dairy Science*. 75: 2762-2768.
- GRAY F.V., WELLER R.A., PILGRIM A.F., JONES G.B. 1966. Rates of production of volatile fatty acids in the rumen. III. Measurement of production *in vivo* by two isotope dilution procedures. *Australian Journal of Agricultural Research*. 17: 69-
- GRAY F.V., WELLER R.A., PILGRIM A.F., JONES G.B. 1967. Rates of production of volatile fatty acids in the rumen. V. Evaluation of Fodder in terms of volatile fatty acids produced in the rumen of sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*. 18: 625-
- GRAY F.V., PILGRIM A.F., WELLER R.A. 1958. The digestion of foodstuffs in the stomach of the sheep and the passage of digesta through its compartments. 1. Cellulose, pentosans and solids. *British Journal of Nutrition*. 12:404-
- 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.
- HA J.K., KENNELLY J.J. 1984. Influence of freeze-storage on nucleic acid concentrations in bacteria and duodenal digesta. *Canadian Journal of Animal Science* 64: 791-793.
- HADJIPANAYIOTOU M., ANTONIOU T. 1983. A comparison of rumen fermentation patterns in sheep and goats given a variety of diets. *Journal Science of Food and Agriculture*. 34: 1319-1322.

- HADJIPANAYIOTOU M., KOUMAS A., GEORGHIADES E., HADJIDEMETRIOU D. 1988. Studies on degradation and outflow rate of protein supplements in the rumen of dry and lactating Chios ewes and damascus goats. *Animal Production*. 46: 243-248.
- HAGERMAN A. E., BUTLER L.G. 1991. Tannins and lignins. En: *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites. The chemical participants*. (Eds. G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum). Academic Press, New York, (Estados Unidos). Vol 1 pp. 355-388.
- HAGERMAN A. E., BUTLER L.G. 1991. Tannins and lignins. En: *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites. The chemical participants*. (Eds. G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum). Academic Press, New York, (Estados Unidos). Vol 1 pp. 355-388.
- HAGERMAN A.E., BUTLER L.G. 1980. Condensed tannin purification and characterisation of tannin associated proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 28: 947-952.
- HAGERMAN A.E., BUTLER L.G. 1981. The specificity of pronantocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*. 256: 4494-4497.
- HAGERMAN A.E., ROBBINS C.T., WEERASURIYA Y., WILSON T.C., MCARTHUR C. 1992. Tannin chemistry in relation to digestion. *Journal of Range Management*. 45: 57-62.
- 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 soja bean products. *Animal Feed Science and Technology*. 16: 51-62.
- HARBONE J.B. 1993. Introduction to Ecological Biochemistry. *Academic Press*. London.
- HAROLD F.M. 1970. Antimicrobial agents and membrane function. En: *Advances in Microbial Physiology*. (Eds: Rose, A.H., Wilkinson, J.F.), Vol. 4. Academic Press, London.
- HARRIS H.B. 1969. Bird resistance in sorghum. *Proceedings of the Annual Corn and Sorghum Research Conference* (Chicago). pp. 113-122.
- HASLAM E. 1981. Vegetable Tannins. In: *The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise*. Vol. 7, Chapter 18, pp: 527-556. Eds.: P.K. Stumpf and E.E. Conn. Academic Press.
- HASLAM E., OPLE C.B.T., PORTER L.J. 1977. Procyanidin metabolism – a hypothesis. *Phytochemistry*. 16: 99-102.
- HAVREVOLL Ø., NEDKVITNE J.J., MATRE T., VOLDEN H., EIK L.O., BERG J. 1992. Protein-normer for ungdyr og sau. HusdyforsØksmotet, 1992, 615-620. FAGINFO nr. 13 1992. *Statens fagtjeneste for landbruket*.

- HEMINGWAY R. 1989. Reactions at the interflavanoid bond of proanthocyanidins. In: *Chemistry and significance of condensed tannins*. pp. 265-283. Eds.: R.W. Hemingway and J.J. Karchesy. Plenum. P.C. N.Y.
- HENIS Y, TAGARI H, VOLCANI R. 1964. Effects of water extracts of carob pods, tannic acids, and their derivatives on the morphology and growth of microorganisms. *Applied Microbiology*. 12: 204-209.
- HERGET H.L. 1989. Hemlock and spruce tannins: an odyssey. In: *Chemistry and significance of condensed tannins*. pp. 3. Eds.: R.W. Hemingway and J.J. Karchesy. Plenum. USA.
- HERVÁS G., FRUTOS P., SERRANO E., MANTECÓN A.R., GIRALDEZ F.J. 2000. Effect of tannic acid on rumen degradation and intestinal digestion of treated soya bean meals in sheep. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. 135: 305-310.
- HESPELL R.B. 1984. Influence of ammonia assimilation pathways and survival strategy on ruminal microbial growth. En: *Herbivores Nutrition in the Subtropics and Tropics*. (Eds: Gilchrist F.M.C. and Mackie R.I.) The Science Press, Pretoria. pp 346-358.
- HESPELL R.B., BRYANT M.P. 1979. Efficiency of rumen microbial growth: Influence of some theoretical and experimental factors on Y_{ATP} . *Journal of Animal Science*. 49: 1640-1659.
- HILTNER, P., DEHORITY, B. A. 1983. Effect of soluble carbohydrates on digestion of cellulose by pure cultures of rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 46: 642- 648.
- HILLMAN K., WILLIAMS A.G., LLOYD D. 1991. Evaluation of matrices in the rumen simulation technique (Rusitec) for maintenance ciliate protozoa. *Letters in Applied Microbiology*. 12: 129-132.
- HOBSON P.N. 1965. Continuous culture of some anaerobes and facultative anaerobic rumen bacteria. *Journal of General Microbiology*. 38: 167-173.
- HOBSON P.N. 1971. Rumen microorganisms. *Progress in Industrial Microbiology*. 9: 42-77.
- HOBSON P.N. Wallace R.J. 1982b. Microbial ecology and activities in the rumen: part II. *CRC Critical Reviews Microbiology*. 9: 253-319.
- HOBSON P.N., MCDUGALL E.I., SUMMERS R. 1968. The nitrogen source of *bacteroides amylophilus*. *Journal of General Microbiology*. 50,i.
- HOBSON P.N., SUMMERS R.. 1967. The continuous culture of anaerobic bacteria. *Journal of General Microbiology*. 47:53-65.

- HOBSON P.N., WALLACE R.J. 1982a. Microbial ecology and activities in the rumen: Part 1. *Critical Reviews in Microbiology*. 9: 165-225.
- HODGSON J.C., THOMAS P.C. 1975. A relationship between the molar proportion of propionic acid and clearance rate of the lipid phase in the rumen of the sheep. *British Journal of Nutrition*. 33: 447-456.
- HONGERHOLT D.D., VARGA G.A., MULLER L.D. 1998. Effects of feeding dried grass pasture and a grain ration differing in rumen undegradable protein at two feeding frequencies on nutrient digestibility and microbial protein synthesis during continuous culture. *Animal Feed Science and Technology*. 74: 1-13.
- HOOVER W.H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *Journal of Dairy Science*. 69: 2755-2766.
- HOOVER W.H., CRAWFORD R.J., STERN M.D. 1982. Effects of solid and liquid fluids flows on fermentation in continuous cultures III. Solids retention time. *Journal of Animal Science*. 54: 849-854.
- HOOVER W.H., CROOKER B.A., SNIFFEN C.J. 1976a. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *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., KNOWLTON P.H., STERN M.D., SNIFFEN C.J. 1976b. Effects of differential solid-liquid removal rates on fermentation parameters in continuous cultures of rumen contents. *Journal of Animal Science*. 43: 535-542.
- HOOVER W.H., MILLER T.K., STOKES S. R. 1989. Effects of fish meals on rumen bacterial fermentation in continuous culture. *Journal of Dairy Science*. 72: 2991-2998.
- HORIGANE A. HORIGUCHI M. 1990. Nutritional aspects and metabolism of aminophosphonic acids in ruminants. En: *The Rumen Ecosystem. The Microbial Metabolism and Its Regulation*. (Eds: Hoshino S., Odonera R., Minato H., Itabashi H.). SpringerVerlag, New York, NY. Page 51.
- HORTON G.M.J., NICHOLSON H.H. 1980. Rumen metabolism and feedlot responses by steers feed tylosin and monensin. *Canadian Journal of Animal Science*. 60: 919-24.
- HOW 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, Cambridge*. 111: 107-114.

- HSU J.T., FAHEY G.C. 1990. Effects of centrifugation speed and freezing on composition of ruminal bacteria samples collected from defaunated sheep. *Journal of Dairy Science*. 73: 149-152.
- HUHTANEN P., KHALILI H. 1989. The effect of sucrose supplements on microbial polysaccharidase activities associated with rumen particulate material. En: *The rumen Ecosystem. The Microbial Metabolism and its Regulation*. (Eds: Hoshino S., Onodera R., Minato H., Itabashi H.) Japan Scientific Societies Press. Springer-verlag. pp. 121-128.
- HUHTANEN P., KHALILI H. 1992. The effect of sucrose supplements on particle-associated carboxymethylcellulase (EC 3.2.1.4) and xylanase (EC 3.2.1.8) activities in cattle given grass-silage-based diet. *British Journal of Nutrition*. 67: 245-255.
- HUME I.D. 1970. Synthesis of microbial protein in the rumen. III: The effect of dietary protein. *Australian Journal of Agricultural Research*. 21: 304-314.
- HUME I.D. 1975. Use of ³⁵S to estimate the proportion of dietary protein degraded in the rumen. P. 1. Tracer studies on Nonprotein Nitrogen for Ruminant II. FAO/IAEA.
- HUME I.D., BIRD P.R. 1970. Synthesis of microbial protein in the rumen. IV. The influence of the level and form of dietary sulfur. *Australian Journal of Agricultural Research*. 21:315-
- HUME I.D., MOIR R.J., SOMERS M. 1970. Synthesis of microbial in the rumen. I. Influence of the level of nitrogen intake. *Australian Journal of Agricultural Research*. 21:283-
- HUNGATE R.E. 1944. Studies on cellulose fermentation .I. The culture and physiology of an anaerobic cellulose digesting bacterium. *Journal of Bacteriology*. 48: 499-513.
- HUNGATE R.E. 1966. *The Rumen and its Microbes*. Academic Press, New York. 65-26041. 533 pgs.
- HUNGATE R.E. 1967. Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation. *Archives of Microbiology*. 59: 158-64.
- HUNGATE R.E., FLETCHER D.W., DOUGHERTY R.W., BARRENTINE B.F. 1955. *Applied Microbiology*. 3: 161-
- HUSSEIN H.S., STERN M.D., JORDAN R.M. 1991. Influence of dietary protein and carbohydrate sources on nitrogen metabolism and carbohydrate fermentation by ruminal microbes in continuous culture. *Journal of Animal Science*. 69: 2123-2133.
- 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. 1985. Digestibility of rumen microbial protein and undegraded dietary protein estimated in the small intestine of sheep and by *in sacco* procedure. *Acta Agriculturae Scandinavica, Supplementum*. 25: 132-144.
- HVELPLUND T. 1986. The influence of diet on nitrogen and amino acid content of mixed rumen bacteria. *Act. Agr. Sc.* 36, 325-331.
- HVELPLUND T., HOVELL F.D.DEB., ØRSKOV E.R., KYLE A.J. 1994. True intestinal digestibility of protein estimated with sheep on intragastric infusion and with the mobile bag technique. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*. 3: 64 (Abstr.).
- 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, Supplementum*. 25: 21-32.
- HVELPLUND T., WEISBJERG M.R. 2000. *In situ* techniques for the estimation of protein degradability and post rumen availability. En: *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. (Eds. D.I. Givens, E. Owen, R.F.E. Axford y H.M. Omed). CAB International, 233-258.
- HVELPLUND T., WEISBJERG M.R., ANDERSEN L.S. 1992. Estimation of the true digestibility of rumen undegraded dietary protein in the small intestine of ruminants by the mobile bag technique. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A, Animal Science*. 42: 34-39.
- IBRAHIM E.A., INGALLS J.R., BRAGG D.B. 1970. Separation and identification of amino acid presents in rumen microorganisms. *Canadian Journal of Animal Science*. 50: 397-400.
- ILLG D.J. 1990. Influence of protein degradation and lipid source on ruminal fermentation in continuous culture. *Ph.D. Diss.*, Univ. Minnesota, St. Paul.
- INRA 1989.
- ISAACSON H.R., HINDS F.C., BRYANT M.P., OWENS F.N. 1975. Efficiency of energy utilization by mixed rumen bacteria in continuous culture. *Journal of Dairy Science*. 58:1645-1659.
- ISAC M.D., GARCÍA M.A., AGUILERA J.F., MOLINA ALCAIDE E. 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. *Archives of Animal Nutrition*. 46: 37-50.
- JANSMAN A.J.M. 1993. Tannins in feedstuffs for simple-stomached animals. *Nutrition Research Reviews*. 6: 209-236.

- JAYASURIYA M.C.M., HAMILTON R., URIYAPONGSON S., ESKEW D.L. 1988. Fermentation of straw based diets containing Azolla (*Azolla caroliniana* Willd) using the rumen simulation technique (RUSITEC). *Biological Wastes* 24: 213-226.
- JENKINS T. C., PALMQUIST D. L. 1984. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations *Journal of Dairy Science*. 67: 978-986.
- JENKINS T.C., FOUTOUHI N. 1990. Effects of lecithin and corn oil on site of digestion, ruminal fermentation and microbial protein synthesis in sheep. *Journal of Animal Science*. 68: 460-
- JONES G.A., MCALLISTER T.A., CHENG K.J., MUIR A.D. 1994. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop) condensed tannins on growth and proteolysis by 4 strains of rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 1374-1378.
- JONES W.T., MANGAN J.L. 1977. Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reserval by polyethylene glycol and pH. *Journal of the Science Food and Agriculture*. 28: 126-136.
- JOUANY J.P. 1982. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Science Alimentaria*. 2: 131-144.
- JOUANY J.P. 1994. Manipulation of microbial activity in the rumen. *Archiv Fur Tierernahrung*. 64: 133-153.
- JOUANY J.P., THIVEND P. 1986. *In vitro* effects of avoparcin on protein degradability and rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 15: 215-229.
- KAITHO R.J., UMUMA N.N., NSAHLAI I.V., TAMMINGA S., VAN BRUCHEM J. 1998. Digestibility of rumen undegradable protein from 40 browse species measured by mobile bag and *in vitro* technique. Occasional publication. No 22. *British Society of Animal Science*. 123-126.
- 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.
- KASE K., HAGINO H., NAKAYAMA K. 1970. *Nipón Nôgeikagaku Kaishi*. 44: 457-
- KAUFMANN W., LÜPPING W. 1982. Protected proteins and amino acids for ruminants. En: *Protein contribution of foods for ruminants: application to feed formulation* (Eds. E.L. Miller, I. H. Pike and A.J.H. van Es). Butterworth Scientific, London, 36-75.

- KENNEDY P.M., CHRISTOPHERSON R.J., MILLIGAN L.P. 1976. The effect of cold exposure of sheep on digestion, rumen turnover and efficiency of microbial synthesis. *British Journal of Nutrition*. 36: 231-
- KENNEDY P.M., CHRISTOPHERSON R.J., MILLIGAN L.P. 1986. Digestive responses to cold. En: *Control of digestion and metabolism in ruminants*. (Eds: Milligan L.P., Grovum W.L., Dobson A.) Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- KERNICK B.L 1991. The effect of form of nitrogen on the efficiency of protein synthesis by rumen bacteria in continuous culture. *Tesis Doctoral*. Universidad de Natal.
- KHAZAAL K., BOZA J., ØRSKOV E.R. 1994. Assessment of phenolics-related antinutritive effects in Mediterranean browse: a comparison between the use of the *in vitro* gas production technique with or without polyvinilpolypyrrolidone or nylon bag. *Animal Feed Science and Technology*. 49: 133-149.
- KHAZAAL K.A., PARISSI Z., TSIIOUVARAS C., NASTIS A., ØRSKOV E.R. 1996. Assessment of phenolics-related antinutritive levels using the *in vitro* gas production technique: a comparison between different types of polyvinylpolypyrrolidone or polyethylene glycol. *Journal of Science Food*. 71: 405-414.
- KIRITSAKIS A.K. 1992. El aceite de oliva. (Ed: A. Madrid Vicente). Madrid. pp. 306.
- KLUSMEYER T. H., LYNCH G. L., CLARK J. H., NELSON D. R. 1991 Effects of calcium salts of fatty acids and protein source on ruminal fermentation and nutrient flow to duodenum of cows. *Journal of Dairy Science*. 74: 2206-2219.
- KLUSMEYER T.H., LYNCH G.L., CLARK J.H., NELSON, D.R. 1991. Effects of calcium salts of fatty acids and protein source on ruminal fermentation and nutrient flow to duodenum of cows. *Journal of Dairy Science*. 74: 2206-
- KOHN R.A., ALLEN M.S. 1995. *In vitro* protein degradation of feeds using concentrated enzymes extracted from rumen contents. *Animal Feed Science and Technology*. 52: 15-28.
- KOMISARCZUK S. 1985. Etude de l'influence du phosphore sur l'activité fermentaire, la proteosynthèse et les teneurs en ATP de continus du rumen dans les différents systèmes de culture continue. Thèse de Doctorat en Sciences, Université Paris-Sud, centre d'Orsay, 200 pp.
- KOMISARCZUK S., DURAND M., BEAUMATIN PH., HANNEQUART G. 1987a. Utilisation de l'azote 15 pour la mesure de la protéosynthèse microbienne dans les phases solide et liquide d'un fermenteur semi-continu (Rusitec). *Reproduction, Nutrition, Development*. 27 (1B): 261-262.

- KOMISARCZUK S., DURAND M., BEAUMATIN PH., HANNEQUART G. 1987b. Effect of phosphorus deficiency on rumen microbial activity associated with the solid and liquid phases of a fermentor (Rusitec). *Reproduction, Nutrition, Development*. 27: 907-919.
- KOMISARCZUK S., MERRY R.J., MCALLAN A.B. 1987c. Effect of different levels of phosphorus on rumen microbial fermentation and synthesis determined using a continuous culture technique. *British Journal of Nutrition*. 57: 279-290.
- KORHONEN M., AHVENJÄRVI S., VANHATALO A., HUHTANEN P. 2002. Supplementing barley or rapeseed meal to dairy cows fed grass-red clover silage: II. Amino acid profile of microbial fractions. *Journal of Animal Science*. 80: 2188-2196.
- KOUPAI-ABYAZAANI, M.R., MCCALLUM J., MUIR A.D., LEES G.L., BOHM B.A., TOWERS G.H.N., GRUBER M.Y. 1993. Purification and characterization of a proanthocyanidin polymer from seed of alfalfa (*Medicago sativa* Cv. Beaver) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41: 565-569.
- KRISHNAMOORTHY U., SNIFFEN C.J., VAN SOEST P.J. 1982. Nitrogen fractionation in ruminant feedstuffs for feed evaluation. *Proceeding of Cornell Nutrition Conference*, pp. 59-102.
- KROPP J.R., JOHNSON R.R., MALES J.R., OWENS F.N. 1977a. Microbial protein synthesis with low quality roughage rations: Isonitrogenous substitution of urea for soybean meal. *Journal of Animal Science*. 45:844-854.
- KRUMHOLZ L.R., BRYANT M.P. 1986a. *Eubacterium oxidoreducens* sp. nov. requiring H₂ or formate to degrade gallate, pyrogallol, phloroglucinol and quercetin. *Archives Microbiology*. 144: 8-14.
- KRUMHOLZ L.R., BRYANT M.P. 1986b. *Syntrophococcus sucromutans* sp. nov. gen. Uses carbohydrates as electron donors and formate, methoxymonobenzoides or *Methanobrevibacter* as electron acceptor systems. *Archives Microbiology*. 143: 313-318.
- KUMAR R., SINGH M. 1984. Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 32: 447-453.
- KUMAR R., VAITHIYANATHAN S. 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Animal Feed Science and Technology*. 30: 21-38.
- KUSUMANTI E., WEISBJERG M.R., HVELPLUND T. 1996. A comparison between protein disappearance from the mobile bag and acid detergent solubility of nitrogen as estimates of protein digestibility in ruminants. *Journal of Animal and Feed Science*. 5: 337-345.

- LEEDLE J.A.Z., BRYANT M.P., HESPELL R.B. 1982. Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low-or high-forage diets. *Applied and Environmental Microbiology*. 44:402-412.
- LEGAY-CARMIER F., BAUCHART D. 1989. Distribution of bacteria in the rumen contents of dairy cows given a diet supplement with soya bean oil. *British Journal of Nutrition*. 61: 725-740.
- LENG R.A., NOLAN J.V. 1984. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*. 67: 1072-1089.
- LEWIS G.N., YAMAMOTO E. 1989. Tannins- Their place in plant metabolism. In: *Chemistry and significance of condensed tannins*. pp. 23-45. Eds.: R.W. Hemingway and J.J. Karchesy. Plenum. USA.
- LIN K.W., PATTERSON J.A., LADISCH M.R. 1985. Anaerobic fermentation : microbes from ruminants. *Enzyme and Microbial Technology*. 7: 98-107.
- LINDBERG J.E. 1986. prediction of rumen degradability of feed proteins from buffer-solubility measurements, pp.59-60 in EAAP publ. No 35.
- LINDBERG J.E., TERNRUD J.E., THEANDER O. 1984. Degradation rate and chemical composition of different types of alkali-treated straws during rumen digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 35: 500-506.
- LINDBERG J.I. 1985. Estimation of rumen degradability of feed proteins with the in sacco technique and various in vitro methods: a review. *Acta Agriculturae Scandinavica Supplement*. 25: 64-97.
- LINDBERG J.I., KNUTSSON P.G. 1981. Effect of bag pore on the loss of particulate matter and on the degradation of cell wall fibre. *Agriculture and Environment*. 6: 171-182.
- LINDBERG J.I., TERNRUD I.E., THEANDER O. 1984. degradation rate and chemical composition of different types of alkali-treated straws during rumen digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 35:500-506.
- LINDBERG J.I., VARVIKKO T. 1982. The effect of bag pore size on the ruminal degradation of dry matter, nitrogenous compounds and cell walls in nylon bags. *Swedish Journal of Agricultural Research*. 12:136-171.
- LING J.R., ARMSTEAD I.P. 1995. The *in vivo* uptake and metabolism of peptides and amino acids by five species of rumen bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 78: 116-124.

- LING J.R., BUTTERY P.J. 1978. The simultaneous use of ribonucleic acid, ^{35}S , 2,6-diaminopimelic acid and 2-aminoethylphosphonic acid as markers for microbial nitrogen entering the duodenum of sheep. *British Journal of Nutrition*. 39: 165-179.
- LOERCH S.C., BERGER L.L., PLEGGE S.D., FAHEY G.C. JR. 1983. Digestibility and rumen escape of soyabean meal, blood meal, meat and bone meal and dehydrated alfalfa nitrogen. *Journal of Animal Science*. 57: 1037-1047.
- LOUKAS M., KRIMBAS C.B. 1983. History of olive cultivars based on their genetic distances. *J. Hort. Science*. 58:121.
- LOWRY J.B., KENNEDY P.M. 1996. Fermentation of flavonols by rumen microorganisms. *Proceeding of Australian Society and Animal Production*. 21: 366.
- LU C.D., TSAI L.S., SCHAEFER D.M, JORGENSEN N.A. 1987. Alteration of fermentation in continuous culture of mixed rumen bacteria by isolated alfalfa saponins. *Journal of Dairy Science*. 70: 799-805.
- MACKIE R.I., GILCHRIST F. M., ROBERTS A. M., HANNAH P. E., SCHWARTZ H.M. 1978. Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *Journal of Agricultural Science. Cambridge*, 90: 241-254.
- MACKIE R.I., GILCHRIST F.M., ROBERTS A.M., HANNAH P.E., SCHWARTZ H.M. 1978. Microbial and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *Journal of Agricultural Science*. 90: 241-54.
- MADSEN J., HVELPLUND T. 1985. Protein degradation in the rumen. A comparison between *in vivo*, nylon bag, *in vitro* and buffer measurements. *Acta Agriculturae Scandinavica Supplementum* 25: 103-124.
- MADSEN J., HVELPLUND T., WEISBJERG M.R., BERTILSSON J., OLSSON I., SPÖRNDLY R., HARSTAD O.M., VOLDEN H., TUORI M., VARVIKKO T., HUHTANEN P., OLAFSSON B.L. 1995. The AAT/PBV protein evaluation system for ruminants. A revision. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*. Supplement No. 19. 37 pgs.
- MAKKAR H.P.S., BECKER K. 1996a. Effect of pH, temperature, and time on inactivation of tannins and possible implications in detannification studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 1291-1295.
- MAKKAR H.P.S., BECKER K. 1996b. Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera* leaves. *Animal Feed Science and technology*. 63: 211-228.

- MAKKAR H.P.S., BECKER K. 1999. Purine quantification in digesta for ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. *British Journal of Nutrition*. 81: 107-112.
- MAKKAR H.P.S., BECKER K., ABEL H.J., SZEGLETTI C. 1995a. Degradation of condensed tannins by rumen microbes exposed to quebracho tannins (QT) in rumen simulation technique (RUSITEC) and effects of QT on fermentation processes in the RUSITEC. *Journal of Science Food and Agriculture*. 69: 495-500.
- MAKKAR H.P.S., BLÜMMEL M, BECKER K. 1995c. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycol and tannins, and their implication in gas production and true digestibility *in vitro* techniques. *British Journal of Nutrition*. 73: 481-493.
- MAKKAR H.P.S., BLÜMMEL M., BECKER K. 1995b. *In vitro* effects and interactions of tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *Journal of Science Food and Agriculture*. 69: 481-493.
- MAKKAR H.P.S., DAWRA R.K., SINGH B. 1990. *In vitro* effect of oak tannins on some hydrolytic and ammonia assimilating enzymes of the bovine rumen. *Indian Journal of Animal Nutrition*. 7 (3): 207-210.
- MANGAN J.L. 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition Research Reviews*. 1: 209-231.
- MANN S.O., ORSKOV E.R. 1975. The effect of feeding whole or pelted barley to lambs on their rumen bacterial populations and pH. *Proceedings of the Nutrition Society*. 34, 63A.
- MANSFIELD H.R., ENDRES M.I., STERN M.D. 1994. Influence of non-fibrous carbohydrate and degradable intake protein on fermentation by ruminal microorganisms in continuous culture. *Journal of Animal Science*. 72: 2464-2474.
- MANSFIELD H.R., ENDRES M.I., STERN M.D. 1995. Comparison of microbial fermentation in the rumen of dairy cows and dual flow continuous culture. *Animal Feed Science and Technology*. 55: 47-66.
- MARQUARDT R.R. 1983. Antimetabolites in faba beans: metabolic significance. *FABIS*. 7: 1-4.
- MARSTON H.R. 1948. The fermentation of cellulose *in vitro* by organisms from the rumen of sheep. *Biochemical Journal*. 42: 564-574.
- MARTILOTTI F., DANESE V. 1983. Digeribilità *in vitro* di prodotti legnosi trattati con soda a ammoniacca. Stima del valore nutritivo. *Annali Dell Istituto Superiore Zootec*.

- MARTIN A.K. 1982. The origin of urinary aromatic compounds excreted by ruminants 2. The metabolism of phenolic cinnamic acids to benzoic acid. *British Journal of Nutrition*. 47: 155-164.
- MARTIN C., WILLIAMS A.G., MICHALET-DOREAU B. 1994. Insolation 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 mediante técnicas de simulación. *Tesis Doctoral*, Universidad de Granada. 269 pgs.
- MARTÍN GARCÍA A.I., MOUMEN A., YÁNEZ RUIZ D.R., MOLINA ALCAIDE E. 2003. *Animal Feed Science and Technology*. (en prensa).
- MARTÍN-ORÚE S.M., BALCELLS J., GUADA J.A., FONDEVILA M. 2000. Microbial nitrogen production in growing heifers: direct measurement of duodenal flow of purine bases versus urinary excretion of purine derivatives as estimation procedures. *Animal Feed Science and Technology*. 88: 171-188.
- MARTIN-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.
- MASSON C., FAURIE F. 1989. Contribution à l'étude comparative de la digestion caecale chez les ovins et les caprins: premières observations sur pH, azote ammoniacal et acides gras volatils. *Annales de Zootechnie*. 38: 1-4.
- MASSON H.A., DENHOLM A.M., LING J.R. 1991. *In vivo* metabolism of 2,2'-diaminopimelic acid from gram-positive and gram-negative bacterial cells by ruminal microorganisms and ruminants and its use as a marker of bacterial biomass. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 1714-1720.
- MATHERS J.C., MILLER E.L. 1981. Quantitation studies of food protein degradation and the energetic efficiency of microbial protein synthesis in the rumen of sheep given chopped Lucerne and rolled barley. *British Journal of Science*. 45: 587.
- MAYMONE B., BATTAGLINI A., TIBERIO M. 1961. Ricerche sul valore nutritivo della sansa d'olive. *Annali Dell Istituto Superiore Zootechnie*. 2: 219-231.
- MAYMONE B., SBLENDOIRO A., CECI GINESTRELLI D. 1950. Ricerche sulla composizione chimica, sulla digeribilità e sul valore nutritivo delle foglie di olivo (*Olea Europaea L.*) verdi, essicate, insilate. *Annali Dell Istituto Superiore Zootechnie*. 4: 1-19.

- MCALLAN A.B. 1982. The fate of nucleic acids in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*. 41: 309-317.
- MCALLAN A.B., SMITH R.H. 1969. Nucleic acid metabolism in the ruminant. Determination of nucleic acids in digesta. *British Journal of Nutrition*. 23: 671-682.
- MCALLAN A.B., SMITH R.H. 1973a. Degradation of nucleic acids in the rumen. *British Journal of Nutrition*. 29: 331-345.
- MCALLAN A.B., SMITH R.H. 1973b. Degradation of nucleic acids derivatives by rumen bacteria *in vitro*. *British Journal of Nutrition*. 29: 467-474.
- MCALLAN A.B., SMITH R.H. 1976a. Effect of dietary nitrogen source on carbohydrate metabolism in the rumen of the young steer. *British Journal of Nutrition*. 36: 511-522
- McAllan A.B., Smith R.H. 1976b. Interrelationships between different chemical components in mixed rumen bacteria. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. 86: 639-642.
- MCALLISTER T.K., BAE H.D., MUIR A., YANKE L.J., CHENG K.J. 1994. Effect of birdsfoot trefoil condensed tannins on endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by ruminal fungi. *Canadian Journal of Microbiology*. 40: 298-305.
- MCDUGALL E.I. 1948. Studies on ruminant saliva 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal*. 43: 99-109.
- MCLEOD M.N. 1974. Plants tannins; their role in forage quality. *Nutrition Abstracts Reviews*. 44: 803-815.
- MCMANUS J.P., DAVIS K.G., LILLEY T.H., HASLAM E. 1981. The association of proteins with polyphenols. *J.C.S. Chem. Comm.*, 309-311.
- MCMENIMAN N.P., BEN-GHEDALIA D., ARMSTONG D.G. 1976b. Nitrogen-energy interactions in rumen fermentation. En: *Protein Metabolism and Nutrition*. (Eds: D. J. A. Cole, K.N. Boorman, P.J. Buttery, D. Lewis, R. J. Neale, H. Swan). Butterworth Inc., Boston, MA.
- MENNAB W.C., WAGHORN G.C., PETERS J.S., BARRY T.N. 1996. The effect of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on the solubilization and degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (EC 4.1.1.39; Rubisco) protein in the rumen and the sites of Rubisco digestion. *British Journal of Nutrition*. 76: 535-549.
- MCSWEENEY C.S., MACKIE R.I. 1997. Gastrointestinal detoxification and digestive disorders in ruminant animals. En: *Gastrointestinal Microbiology*. (Eds: Mackie R.I., White B.A), Vol. 1. Chapman & Hall, New York, pp. 583-634.

- MCSWEENEY C.S., PALMER B., MCNEILL D.M., KRAUSE D.O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 91: 83-93.
- MEHREZ A.Z., ORSKOV E.R. 1977. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. 88: 645-650.
- 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.
- MENKE K.H., RAAB L., SALEWSKI A., STEINGASS H., FRITZ D., SCHNEIDER W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy of ruminant feedings stuff from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. 93: 217-222.
- MERCHEN N.R., FIRKINS J.L., BERGER L.L. 1986. Effect of intake and forage level on ruminal turnover rates, bacterial protein synthesis and duodenal amino acid flows in sheep. *Journal of Animal Science*. 62: 216-225.
- 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., MCALLAN A.B., SMITH R.H. 1990. *In vitro* continuous culture studies on the effect of nitrogen source on the rumen microbial growth and fibre digestion. *Animal Feed Science and Technology*. 31: 55-64.
- MERRY R.J., SMITH R.H., MCALLAN A.B. 1987. Studies of rumen function in an *in vitro* continuous culture. *Archives of Animal Nutrition. Berlin*. 37: 475-488.
- MGHENI D.M., HVELPLUND T., WEISBJERG M.R. 1994. Intestinal digestibility of rumen undegraded dietary protein from tropical roughages estimated by the mobile bag technique *Acta Agrulturae Scandinavica*. 44: 230-235.
- MICHALET DOREAU B., OULD BAH M. 1992. *In vitro* and *in sacco* methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 40: 57-86.
- MIETTINEN H., SETÄLÄ J. 1989. Design and development of a continuous culture system to study rumen fermentation. *Journal of Agricultural Science Finland*. 61: 463-473.

- MILLER E.L. 1982. The nitrogen needs for ruminants. En: *Forage Protein in Ruminant Animal Production*. (Eds. D.J. Thomson, D.E. Beever, R.G. Gunn), 79-87.
- MIN B.R., MCNABB W.C., BARRY T.N. KEMP P.D., WAGHORN G.C., McDONALD M.F. 1999. The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon reproductive efficiency and wool production in sheep during late summer and autumn. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 132: 323-334.
- MINATO H., MIYAGAWA E., SUTO T. 1990. Techniques for analysis of rumen microbial ecosystem. In: Hoshino S., Onodera R., Minato H., Itabashi H. (Eds.), *The rumen ecosystem, The Microbial Metabolism and Its Regulation*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- MINATO H., SUTO T. 1981. Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem: IV. Attachment of rumen bacteria to cellulose powder and elution of bacteria attached to it. *Journal General Applied Microbiology*. 27: 21-31.
- Ministerio de Agricultura y Pesca (MAPA). 2002. Anuario estadístico. www.mapya.es.
- MOHAMMED H.H. 1982. Energy requirement of maintenance and growth: comparison of goats and sheep. *Tesis doctoral*, Universidad de Reading, UK.
- MOLE S., WATERMAN P.G. 1987. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. I. Techniques for chemically defining tannins. *Oecología*. 72: 137-147.
- MOLINA ALCAIDE E., GARCÍA 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., MARTÍN GARCÍA A.I., AGUILERA J.F. 2000. A comparative study of nutrient digestibility, kinetics of degradation and passage and rumen fermentation pattern in goats and sheep offered good-quality diets. *Livestock Production Science*. 64: 215-223.
- MOLINA ALCAIDE E., MARTÍN GARCÍA I., YÁÑEZ RUIZ D.R., AGUILERA J.F. 1999. Características de la fermentación de dietas con distintas proporciones de heno de alfalfa en fermentadores de flujo continuo inoculados con líquido ruminal de ovino o caprino. *ITEA, VIII Jornadas sobre Producción Animal*. 20: 505-507.
- MOLINA ALCAIDE E., NEFZAOU A. 1996. Recycling of olive oil by-products: Possibilities of utilization in animal nutrition. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 38: 225-235.

- MOLINA ALCAIDE E., YÁÑEZ RUIZ D.R., MOUMEN A., MARTÍN GARCÍA A.I. (2003) Availability of olive by-products nitrogen for goats and sheep. *Small Ruminant Research*, (en prensa).
- MOLINA D.O., PELL A.N., HOGUE D.E. 1999. Effects of ruminal inoculations with tannin-tolerant bacteria on fibre and nitrogen digestibility of lambs fed a high condensed tannin diet. *Department of Animal Science*. 81: 69-80.
- MOLINA E. AGUILERA J.F. 1991. Utilisation des sous-produits de l'olivier dans l'alimentation des ovins. *Options Méditerranéennes- Série Séminaires- n° 16*: 163-166.
- MOLINA E., AGUILERA J.F. 1988. Valorisation nutritive d'un grignon d'olive traité à la soude. Utilisation digestive des constituants des parois cellulaires. *Annales de Zootechnie*. 37: 63-72.
- MOLINA-ALCAIDE E., WEISBJERG M.R., HVELPLUND T. 1996. Degradation characteristics of shrubs and the effect of supplementation with urea or protein on microbial production using a continuous culture system. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 75: 121-132.
- MORRISON I.M., BRICE R.E. 1984. The digestion of untreated and ammonia-treated barley straw in an artificial rumen. *Animal Feed Science and Technology*. 10: 229-238.
- MOUJAHED N., KAYOULI C., THEWIS A., BECKERS Y., REZGUI S. 2000. Effect of multinutrient blocks and polyethylene glycol 4000 supplies on intake and digestion by sheep fed *Acacia cyanophylla* Lindl. Foliage-based diets. *Animal Feed Science and Technology*. 88: 219-238.
- Mould F.L. 1988 Associative effects of feeds. In: *Feed Science*. Ed.: Ørskov, E.R. pp. 279-292. Elsevier. Amsterdam.
- MOULD F.L., ØRSKOV E.R., GAULD S.A. 1984a. Associative effects of mixed feeds. II. The effect of dietary additions of bicarbonate salts on the voluntary intake and digestibility of diets containing various proportions of hay and barley. *Animal Feed Science and Technology*. 10: 31-40.
- MOULD F.L., ØRSKOV E.R., GAULD S.A. 1984b. 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.
- MUELLER-HARVEY I., MCALLAN A.B. 1992. Tannins: Their biochemistry and nutritional properties. *Advances Plant Cell Biochemical and Biotechnology*. 1: 151-217.

- MUHAMMED S., STEWART C.S., ACAMOVIC T. 1994. Effects of tannic acid on cellulose degradation adhesion and enzymic activity of rumen microorganisms. *Proceeding Society Nutrition Physiology*. 3: 174 (Abstr.).
- MUÑOZ F., ANGUITA T., LARA L., SUÁREZ A., BOZA J. 1983. La utilización del ramón de olivo en la alimentación del ganado cabrío. *A.Y.M.A.* vol XXIV: 355-358.
- MURDIATI T.B., MCSWEENEY C.S. 1987. Binding properties of hydrolyzable tannins to proteins. In: *Proceedings of the 2nd International Symposium on the Nutrition of Herbivores*. pp. 41-42. Ed.: M. Rose. Brisbane. University of Queensland. Australia.
- MURDIATI T.B., MCSWEENEY C.S., CAMPBELL R.S.F., STOLTZ D.S. 1990. Prevention of hydrolysable tannin toxicity in goats fed *Clidemia hirta* by calcium hydroxide supplementation. *Journal of Applied Toxicology*. 10: 325-331.
- MURDIATI T.B., MCSWEENEY C.S., LOWRY J.B. 1991. Complexing of toxic hydrolysable tannins of yellow-wood (*Terminalia oblongata*) and harendong (*Climedia hirta*) with reactive substances: an approach to preventing toxicity. *Journal of Applied Toxicology*, 11: 333-338.
- MURDIATI T.B., MCSWEENEY C.S., LOWRY J.B. 1992. Metabolism in sheep of gallic acid, tannic acid and hydrolysable tannin from *Terminalia oblongata*. *Australian Journal of Agricultural research*. 43: 1307-1319.
- NAGARAJA T.G., BARTLEY E.E., FINA L.R., ANTHONY H.D. 1978. Relationship of rumen gram-negative bacteria and free endotoxin to lactic acidosis in cattle. *Journal of Animal Science*. 47: 1329-1337.
- NASTIS A.S., MALECHEK J.C. 1981. Digestion and utilization of nutrients in oak browse by goats. *Journal of Animal Science*. 53: 283-290.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). 1985. *Ruminant Nitrogen Usage*. Washington: US National Academy of Science.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1989. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle 6th rev ed* Natl. Acad. Sci., Washington, DC.
- NDOSA J.E.M. 1980. A comparative study of roughage utilisation by sheep and goats. *M.Phil.Thesis*, University of Reading, U.K.
- NEFZAOU A. 1978. Olive pulp in animal feeding. Some results in Tunisia. *Internal Report INRAT*, Túnez.
- NEFZAOU A. 1979. La pulpe d'olive: Principaux acquis et voies de recherches. *Note INRAT*, Túnez. 20 pgs.

- NEFZAOU A. 1983. Etude de l'utilisation des sous-produits de l'oliver en alimentation animale en Tunisie. *Dirección de producción y Salud Animal. FAO.*
- NEFZAOU A. 1985. Valorisation des residus lignocellulosiques dans l'alimentation des ruminants par les traitements aux alcalis. Application aux grignons d'olive. *Tesis Doctoral.* Université Catholique de Louvain. Louvain-la-Neuve, Belgique.
- NEFZAOU A., HELINGS PH., VANBELLE M. 1983. Ensiling olive pulp with ammonia: effects on voluntary intake and digestibility measured by sheep. *34th Annual Meeting of the study Commission EAAP.* 3-6 Octobre, Madrid.
- NEFZAOU A., KSAIER H. 1981. Utilisation de la pulpe d'olive comme aliment de sauvegarde. En *Séminaire International sur la valorisation des sous-produits de l'olivier.* 65-66. Monasir, Túnez.
- NEFZAOU A., MARCHAND S., VENBELLE M. 1982. Valorisation de la pulpe d'olive dans l'alimentation des ruminants. International Colloquium: *Tropical Animal production for the benefit of man.* Amberes, 17-18 Diciembre.
- NEFZAOU A., ZIDANI M. 1987. Les sous-produits de l'olivier. Institut de l'Olivier. Ministère de l'Agriculture Tunisia. p. 136.
- Neirenstein M. 1932. *Incunabula of Tannin Chemistry.* Edward Arnold, London.
- NELSON K.E., PELL A.N., DOANE P.H., GINER CHAVEZ B.I., SCHOFIELD P. 1997. Chemical and biological assays to evaluate bacterial inhibition by tannins. *Journal of Chemical Ecology.* 23: 1175-1194.
- NELSON K.E., PELL A.N., SCHOFIELD P., ZINDER S. 1995. Isolation and characterization of an anaerobic ruminal bacterium capable of degrading hydrolysable tannins. *Applied and Environmental Microbiology.* 61: 3293-3298.
- NELSON K.E., THONMEY M.L., WOOLSTON T.K., ZINDER S.H., PELL A.N. 1998. Phenotypic and phylogenetic characterisation of ruminal tannin-tolerant bacteria. *Applied and Environmental Microbiology.* 64: 3824-3820.
- NEWBOLD C.J., WILLIAMS A.G., CHAMBERLAIN D.G. 1987. The *in vitro* metabolism of D, L-lactic acid by rumen microorganisms. *Journal of Science and Food Agriculture.* 38: 9-18.
- NICHOLSON R.L., BUTLER L.G., ASQUITH T.N. 1986. Glycoproteins from *Collectotrichum graminicola* that bind phenols: implications for survival and virulence of phytopathogenic fungi. *Phytopathology.* 76: 1315-1318.
- NIGH H. 1977. The use of olive leaves as roughage for dairy cattle. *Approp. Technol.* 4: 11.

- NIKOLIC J.A., JOVANOVIĆ M. 1973. Preliminary studies on the use of different methods for determining the proportions of bacterial nitrogen in the total nitrogen of rumen contents. *Journal of Agricultural Science*. 81: 1-7.
- NIKOLIC J.A., JOVANOVIĆ M., FILIPOVIĆ R.. 1975. Microbial protein synthesis by bovine rumen content in relation to ammonia concentration. P. 43. *Studies on Nonprotein Nitrogen for Ruminants II*. FAO/IAEA.
- NOCEK J.E., GRANT A.L. 1987. Characterization of in situ nitrogen and fiber digestion and bacterial nitrogen contamination of hay crop forages preserves at different dry matter percentages. *Journal of Animal Science*. 64: 552-564.
- NORTON B.W., AHN J.H. 1997. A comparison of fresh and dried *Calliandra calothyrsus* supplements for sheep given a basal diet of barley straw. *Journal of Agricultural Science*. 129: 485-494.
- NUÑEZ-HERNANDEZ G., HOLECHEK J.L., WALLACE J.D., GALYEAN M.L., TEMBO A., VALDEZ R., CARDENAS M. 1989. Influence of native shrubs on nutritional status of goats: nitrogen retention. *Journal of Range Management*. 42 (3): 228-233.
- NUÑEZ-HERNANDEZ G., WALLACE J.D., HOLECHEK J.L., GALYEAN M.L., CARDENAS M. 1991. Condensed tannins and nutrient utilization by lambs and goats fed low-quality diets. *Journal of Animal Science*. 69: 1167-1177.
- O'DONOVAN L., BROOKER J.D. 2001. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology*. 147: 1025-1033.
- 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.
- ODENYO A.A., BISHOP R., ASEFA G., JAMNADASS R., ODONGO D., OSUJI P. 2001. Characterization of tannin-tolerant bacterial isolates from East African Ruminants. *Anaerobe*. 7: 5-15.
- ODENYO A.A., OSUJI P.O. 1997. Tannin-resistant ruminal bacteria from East African ruminants. En: *Reproduction, Nutrition, Development Suppl.* Evolution of the Rumen Microbial Ecosystem, INRA, Paris. pp. 78. Eds: Chesson A., Flint H.J., Stewart C.S.
- ODENYO A.A., OSUJI P.O. 1998. Tannin-tolerant ruminal bacteria from East African ruminants. *Canadian Journal of Microbiology*. 44: 905-909.

- OHAJUKURA O.A., WU Z., PALMQUIST D.L. 1991. Ruminal metabolism, fiber, and protein digestion by lactating cows fed calcium soap or animal-vegetable fat. *Journal of Dairy Science*. 74: 2601-
- OLDHAM J.D., BUTTERY P.J., SWAN H., LEWIS D. 1977. Interactions between dietary carbohydrates and nitrogen and digestion in sheep. *Journal of Agricultural Science Cambridge*. 89:467-
- Oldham J.D., Sutton J.D., McAllen A.B. 1979. Protein digestion and utilization by dairy cows. *Annales de Recherches Veterinaires*. 10: 290.
- OLIVIUM, 2002.
- OLUBOBOKUN J.A., CRAIG W.M. 1990. Quantity and characteristics of microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *Journal of Animal Science*. 68: 3360-3370.
- OLUBOBOKUN J.A., CRAIG W.M., NIPPER W.A. 1988. Characteristics of protozoal and bacterial fractions from microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *Journal of Animal Science*. 66: 2701-2710.
- OLUBOBOKUN J.A., CRAIG W.M., POND K.R. 1990. Effects of mastication and microbial contamination on ruminal in situ forage disappearance. *Journal of Animal Science*. 68: 3371-3381.
- ONODERA R., KANDATSU M. 1974. *Agricultural Biological Chemistry*. 38: 913-
- ONODERA R., SHINJO T., KANDATSU M. 1974. *Agricultural Biological Chemistry*. 38:921-
- ORPIN C.G. 1975. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology*. 91: 249-62.
- ORPIN C.G. 1976. The characterisation of the rumen bacterium Eadie's oval magnoovum gen. nov. eadii sp. nov. *Archives of Microbiology*. 111: 155-9.
- ORPIN C.G. 1977a. Invasion of plant tissue in the rumen by flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology*. 98: 423-30.
- ORPIN C.G. 1984. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Animal Feed Science and technology*. 10: 121-143.
- ORPIN C.G., JOBLIN K. N. 1988. The rumen anaerobic fungi, pp. 129-150. En: *The Rumen Microbial Ecosystem*. (Ed: P. N. Hobson). Elsevier Science Publisher, New York..
- ORPIN C.G., JOBLIN K.N. 1989. The rumen fungi. En: *The Rumen Microbial Ecosystem* (Eds: Hobson P.N., Wallace R.J.). Elsevier Applied Science, London, pp. 129-150.

- ØRSKOV E.R., MCDONALD I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. 92: 499-503.
- OSAWA R.O., WALSH T.P. 1993. Visual reading method for detection of bacterial tannase. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 1251-1252.
- OSHIO S., TATA I., MINATO J. 1987. Effects of diets differing in ratios of roughage to concentrate on microflora in the rumen of heifers. *Journal of General Microbiology*. 33: 99.
- OWENS F.N., GOETSCH A.L. 1993. Fermentación ruminal. En: *El rumiante, Fisiología Digestiva y Nutrición*. pp. 159-189. Ed: C.D. Church, Acribia, Zaragoza.
- OWENS F.N., WEAKLEY D.C., GOETSCH A.L. 1984. Modification of rumen fermentation to increase efficiency of fermentation and digestion in the rumen. En: *Herbivore Nutrition in the Subtropics and Tropics*. pp. 435-454. (Eds: F.M.C. Gilshrist and R.I. Mackie). The Science Press. Pretoria.
- PALMQUIST D.L., KINSEY D.J. 1994. Lipolysis and biohydrogenation of fish oil by ruminal microorganisms. *Journal of Dairy Science*. 77 (suppl. 1): 97 (abs.).
- PARELLADA J., GÓMEZ A., GARRIDO A., OCAÑA F. 1984. Obtención del ramón de olivo y utilización en alimentación animal. En: *Nuevas Fuentes de Alimentos para la Producción Animal II*. (Eds: Gómez A., Guerrero J.E., Garrido A.) Universidad de Córdoba, pp. 95-114.
- PERCHELLET E.M., MOUTASEB H.U., MAKKAR H.P.S., PERCHELLET P. 1996. Ability of tannins extracted from various tree leaves to inhibit the biomarkers of tumor promotion in mouse skin *in vivo*. *International Journal of Oncology*. 9: 801-809.
- PERDOCK H.B., LENG R.A., BIRD S.H., HABIB G., VAN HOUTERT M. 1988. Improving livestock production from straw-based diets. En: *Increasing Small Ruminant Productivity in Semiarid Areas* (Eds. E.F. Thomson, F.S. Thomson). Int. Center Agric Res. in Dry Areas, Siria, 81-91.
- PEREIRA J.C., CARRO M.D., GONZÁLEZ J., ALVIR M.R., RODRÍGUEZ C.A. 1998. Rumen degradability and intestinal digestibility of brewers' grains as affected by origin and heat treatment and barley rootlets. *Animal Feed Science and Technology*. 74: 107-121.
- PERERA A.N.F., PERERA E.R.K., GUNASENA H.M.P. 1996. Nutritive value and degradation characteristics of Introduced *Calliandra calothyrsus* provenances. *Proceedings Int. Workshop on the genus Calliandra*, Bogor, Indonesia.

- PÉREZ J.F., BALCELLS J., FONDEVILLA M., GUADA J.A. 1998a. Composition of liquid- and particle-associated bacteria and their contribution to the rumen outflow. *Australian Journal of Agriculture Research*. 49: 907-914.
- PÉREZ J.F., GUADA J.A., CASTRILLO C. 1996a. Determination of rumen microbial-nitrogen production in sheep: a comparison of urinary purine excretion with methods using ^{15}N and purine bases as markers of microbial-nitrogen entering the duodenum. *British Journal of Nutrition*. 75: 699-709.
- PÉREZ J.F., GUADA J.A., CASTRILLO C. 1997a. Contribution of dietary nitrogen and purine bases to the duodenal digesta: comparison of duodenal and polyester-bag measurements. *Journal of Animal Science*. 65: 237-245.
- PÉREZ J.F., GUADA J.A., CASTRILLO C. 1997b. Rumen microbial production estimated either from urinary purine derivative excretion or from direct measurements of ^{15}N and purine bases as microbial markers : effect of protein source and rumen bacteria isolates. *Journal of Animal Science*. 65: 225-236.
- PÉREZ J.F., RODRÍGUEZ C.A., GONZÁLEZ J., BALCELLS J., GUADA J.A. 1996b. Contribution of dietary purine bases to duodenal digesta in sheep. In situ studies of purine degradability corrected for microbial contamination. *Animal Feed Science and Technology*. 62: 251-262.
- PÉREZ MALDONADO R.A., NORTON B.W. 1996. Digestion of ^{14}C -labelled condensed tannins from *Desmodium intortum* in sheep and goats. *British Journal of Nutrition*. 76: 501-513.
- PÉREZ MARTÍNEZ L. 1995. Determinación cromatográfica de aminoácidos previa reacción con fenilocianato. Influencia de β -glucanasas sobre la digestibilidad de aminoácidos. *Tesis Doctoral*, Universidad de Granada.
- POOS-FLOYD M., KLOPFENSTEIN T., BRITTON R.A. 1985. Evaluation of laboratory techniques for predicting ruminal protein degradation. *Journal of Dairy Science*. 68: 829-839.
- PORTER L.J. 1988. Flavan and Proanthocyanidins. In: *The Flavanoids*. pp. 21-62. Ed.: J.B. Harborne. Chapman and Hall. L.T.D. London.
- PORTER L.J. 1989. Tannins. In: *Methods in plant Biochemistry*. pp. 389-419. Vol. 1. Eds.: P.M. Dey and J.B. Harborne. Academic Press.
- POULTON J.E. 1990. Cyanogenesis in plants. *Plant Physiology*. 94: 401-405.

- PREVOT S., BOHATIER J., SENAUD J., SENHAJI M. 1988. Distribution spatio-temporelle des populations microbiennes dans un fermenteur semi-continu de type "Rusitec", en phase d'adaptation. *Reproduction, Nutrition, Développement*. 28 Supplement 1: 83-84.
- 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.
- PROVENZA F.D., BURRITT E.A., PEREVOLOTSKY A., SILANIKOVE N. 2000. Self-regulation of intake of polyethylene glycol by sheep fed diets varying in tannin concentrations. *Journal of Animal Science*. 78: 1206-1212.
- PUNIA B.S., LEIBHOLZ J. 1994. Effect of level of intake of Kikuku (*Pennisetum clandestinum*) grass hay on the flow of protozoal nitrogen to the omasum of cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 47: 77-87.
- Quazi E.H., Thomson K.V. 1984. Source of nitrogen for the rumen microbes. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 34: 26-
- RAE R.C., SMITHARD R.R. 1985. Estimation of true nitrogen digestibility in cattle by a modified nylon bag technique. *Proceedings of Nutrition Society*. 44:116A.
- RAHNEMA S.H., SCHWAB C.G. 1988. Comparison of various amino acids for estimation of microbial nitrogen digesta. *Journal of Animal Science*. 63: 603-612.
- RAMOS G., FRUTOS P., GIRÁLDEZ F.J., MANTECÓN A.R. 1998. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Instituto de zootecnia. Facultad de veterinaria*. 47: 597-620.
- RAMOS G., FRUTOS P., HERVÁS G., GIRÁLDEZ F.J., MANTECÓN A.R. 1999. Degradabilidad *in vitro* de especies arbustivas de puertos de montaña: Efecto de la infusión de quebracho en el rumen de ovejas. *ITEA, Vol. Extra 20, n.º 2*.
- RANILLA GARCÍA M.J. 1995. Estudios comparativos de la fermentación ruminal y la cinegética digestiva en el ganado ovino: variaciones interraciales. *Universidad de León. Facultad de Veterinaria. Departamento de producción Animal I*.
- RANILLA M.J., CARRO M.D. 2003. Diet and procedures used to detach particulate-associated microbes from ruminal digesta influence chemical composition of microbes and estimation of microbial growth in Rusetic fermenters. *Journal of Animal Science*. 81: 537-544.
- RANILLA M.J., CARRO M.D., LOPEZ S., NEWBOLD C.J., WALLACE R.J. 2001. Influence of nitrogen source on the fermentation of fibre from barley straw and sugarbeet pulp by ruminal microorganisms *in vitro*. *British Journal of Nutrition*. 86: 717-724.

- 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* (Rumitec). *ITEA* (Vol. Extra) 22. pp. 382-384.
- REED J.D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*. 73: 1516-1528.
- RÈMOND D., MESHY F., BOIVIN R. 1996. Metabolites, water and mineral exchanges across the rumen wall: mechanisms and regulation. *Annales de Zootechnie*. 45: 97-119.
- RHOADES D.F. 1979. Evolution of plant chemical defense against herbivores. En: *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. (Eds: Rosenthal G.A., Janzen D.H.) Academic Press, New York. pp. 3-54.
- ROBBINS C.T., HANLEY T.A., HAGERMAN A.E., HJERLJORD O., BAKER D.L., SCHWARTZ C.C., MAUTZ W.W. 1987a. Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in protein availability. *Ecology*. 68: 98-107.
- ROBERTSON J.A., HAWKE J.C. 1965. Effect of carbohydrate on ammonia levels in the rumen of pasture-fed cows and in rumen liquors with ryegrass extracts. *Journal of Science Food and Agriculture*. 16: 268-
- ROBERTSON J.B., VAN SOEST P.J. 1981. The detergent system of analysis and its application to human foods. En: *The Analysis of Dietary Fiber*. (Eds: Dekker M., James W.P.T., Theander O.) New York, pp. 123-158.
- RODE L.M., SATTER L.D. 1988. Effect of amount and length of alfalfa hay in diets containing barley or corn on site of digestion and rumen microbial protein synthesis in dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*. 68: 445.
- RODE L.M., WEAHLEY D.C., SATTER L.D. 1985. Effect of forage amount and particle size in diets of lactating dairy cows on site of digestion and microbial protein synthesis. *Canadian Journal of Animal Science*. 65: 101.
- 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.
- ROE M.B., SNIFFEN C.J., CHASE L.E. 1990. Techniques for measuring protein fractions in feedstuffs. En: *Proc. Cornell Nutr. Conf. Feed Manuf.* Pp 81-88. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- ROGER V., FONTY G., KOMISARCZUK-BONY S., GOUET P. 1990. Effects of physicochemical factors on the adhesion to cellulose avicel of the ruminant bacteria

- Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 3081-3087.
- ROHR K. 1986. Physiological aspects in the rumen in relation to the level of production in ruminants. *Archives of Animal Nutrition*. 36: 182-
- ROOKE J.A., AMSTRONG D.G. 1989. The importance of the form of nitrogen on microbial protein synthesis in the rumen of cattle receiving grass silage and continuous intrarumen infusion of sucrose. *British Journal of Nutrition*. 61: 113-121.
- RUFENER W. H., NELSON W.D., WOLIN M.J. 1963. *Applied Microbiology*. 11: 196-
- 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: 604-10
- 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. Ruminant fermentation. *Journal of Animal Science*. 70: 3551-3561.
- RUSSELL J.B., SNIFFEN C.J. 1984. Effect of carbon-4 and carbon-5 volatile fatty acids on growth of mixed rumen bacteria *in vitro*. *Journal of Dairy Science*. 67:987-
- RUSSELL J.B., STROBEL H.J. 1987. Concentration of ammonia across cell membranes of mixed rumen bacteria. *Journal of Dairy Science*. 70: 970-976.
- SALAWU M.B., ACAMOVIC T., STEWART C.S. 1998. *Calliandra calothyrsus* leaf extracts' effects on microbial growth and enzyme activities. En: *Toxic plants and other natural toxicants*, CAB International, Wallingford, UK. pp. 509-513.
- SALAWU M.B., ACAMOVIC T., STEWART C.S., HVELPLUND T., WEISBJERG M.R. 1999a. The use of tannins as silage additives: effects on silage composition and mobile bag disappearance of dry matter and protein. *Animal Feed Science and Technology*. 82: 243-259.
- SALAWU M.B., ACAMOVIC T., STEWART C.S., ROTHHAERT R.L. 1999b. Composition and degradability of different fractions of *Calliandra* leaves, pods and seeds. *Animal Feed Science and Technology*. 77: 181-199.
- SANSOUCY R., ALIBÉS X., MARTILOTTI F., NEFZAOUTI A., ZOIPOULOS P. 1985. Los Subproductos del Olivar en la Alimentación Animal en la Cuenca del Mediterráneo. *Estudio FAO: Producción y Sanidad Animal*. N° 43. p. 46.
- 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.

- SCALBERT A. 1991. Anti-microbial properties of tannins Review article no. 63. *Phytochemistry*. 30 (12): 3875-3883.
- SCHAEFER D.M., DAVIS C.L., BRYANT M.P. 1980. Ammonia saturation constants for predominant species of rumen bacteria. *Journal of Dairy Science*. 63: 1248-1263.
- SCHAUFF D.J., CLARK J.H. 1992. Effects of feeding diets containing calcium salts of long-chain fatty acids to lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 75: 2990-2999.
- SCHELLING G.T., BRYERS F.M. 1984. Cytosine a marker for microbial nitrogen leaving the rumen. *Canadian Journal of Animal Science*. 70: 425-441.
- SCHNIFFEN C.J., ROBINSON P.H. 1987. Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulation. *Journal of Dairy Science*. 70: 425-441.
- SCHOFIELD P., MBUGUA D.M., PELL A.N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 91: 21-40.
- SCHÖNHUSEN ULRIKE , VOIGT J., KREIENBRING F., TEUSCHER F. 1995. Bewertung verschiedener marker für die Messung der Microbiellen Stickstoffpassage am Duodenum der Milchkuh. *Archives of Animal Nutrition*. 48: 147-158.
- SEGUIN A. 1986. Vegetable tannin. In: THE BIOCHEMISTRY OF PLANTS, A COMPREHENSIVE TREATISE. pp. 527-556. Vol. 7. Eds.: P.K. Stumpf and E.E. Conn.
- 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.
- SIDDONS R.C., BEEVER D.E., NOLAN J.V. 1982. A comparison of methods for the estimation of microbial nitrogen in duodenal digesta of sheep. *British Journal of Nutrition*. 48: 377-389.
- SIDDONS R.C., NOLAN J.V., BEEVER D.E., MACRAE J.C. 1985. Nitrogen digestion and metabolism in sheep consuming diets containing constricting forms and levels of N. *British Journal of Nutrition*. 54: 175-187.
- SIJPESTEIJN A.K. 1951. On *Ruminococcus flavefaciens* a cellulose decomposing bacterium from the rumen of sheep and cattle. *Journal of General Microbiology*. 5: 869-79.
- SILANIKOVE N. 2000. The physiological basis of adaptation in goats to harsh environments. *Small Ruminant Research*. 35: 181-193.
- SILANIKOVE N., GILBOA N., NIR I., PEREVOLOTSKY A., NITSAN Z. 1996b. Effect of a daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin-

- containing leaves (*Quercus calliprinos*, *Pistacia lentiscus* and *Ceratonia siliqua*) by goats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 199-205.
- Silanikove N., Gilboa N., Perevolotsky A., Nitsan Z. 1996a. Goats fed tannin-containing leaves do not exhibit toxic syndromes. *Small Ruminant Research*. 21: 195-201.
- SILANIKOVE N., NITSAN Z., PEREVOLOTSKY A. 1994. Effect of a daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin-containing leaves (*Ceratonia siliqua*) by sheep. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 2844-2847.
- SILVA A.T., ØRSKOV E.R. 1988. Fiber degradation in the rumen of animal receiving hay, untreated or ammonia-treated straw. *Animal Feed Science and Technology*. 29: 251-264.
- SIMPSON F.J., JONES G.A., WOLIN E.A. 1969. Anaerobic degradation of some bioflavonoids by microflora of the rumen. *Canadian Journal of Microbiology*. 15: 972-974.
- Singh B. Bhat T.K., Sharma O.P. 2001. Biodegradation of tannic acid in an *in vitro* ruminal system. *Livestock Production Science*. 68: 259-262.
- SKENE I.K., BROOKER J.D. 1995. Characterisation of tannin acylhydrolase activity in the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Anarrobe*. 1: 321-327.
- SKIBA B., WEISBJERG M.R., HVELPLUND T. 1996. Rumen and total intestinal tract digestibility of protein and amino acids from different roughages determined *in situ*. *Journal of Animal and Feed Science*. 5: 347-363.
- SKÓVKO SAJKO H., HVELPLUND T., WEISBJERG M.R. 1994. Rumen degradation and intestinal digestibility of amino acids in different roughages estimated by nylon bag techniques. *Journal of Animal Feed Science*. 3: 1-10.
- SLYTER L.L., NELSON W.O., WOILN M.J. 1964. Modification of a device maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. *Applied Microbiology*. 12: 374-377.
- SLYTER L.L., CHALUPA W. 1986. Sulfur influences on rumen microorganisms *in vitro* and in sheep and calves. *Journal of Animal Science*. 63: 1949-1959.
- SLYTER L.L., PUTNAM P.A. 1967. *In vivo vs in vitro* continuous culture of ruminal microbial population. *Journal of Animal Science*. 26: 1421-1427.
- SMART W.W.G., BELL T.A., STANLEY N.W., COPE W.A. 1961. Inhibition of rumen cellulase by an extract from sericea forage. *Journal of Dairy Science*. 44: 1945-1946.
- 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*. Pp, 399-415. (eds: W.McDonald, A.C.I. Warner) New England Univ. Publishing Unit, Armidale, Australia.
- SMITH R.H., MCALLAN A.B. 1970. Nucleic acid metabolism in the ruminant. 2. Formation of microbial nucleic acids in the rumen in relation to the digestion of food nitrogen and the fate of dietary nucleic acids. *British Journal of Nutrition*. 24: 545-
- SMITH R.H., MCALLAN A.B. 1974. Some factors influencing the chemical composition of mixed rumen bacteria. *British Journal of Nutrition*. 31: 27-34.
- SMITH R.H., MCALLAN A.B., HEWITT P., LEWIS P.E. 1995. Estimations of amounts of microbial and dietary nitrogen compounds entering the duodenum of cattle. *Journal of Agricultural Science*. 90: 557-568.
- SPENCER C.M., YA C., RUSSELL M., GAFFNEY S.H., GOULDING P.N., MAGNOLATO D., LILLEY T.H., HASLAM E. 1988. Polyphenol complexation. Some thoughts and observations. *Phytochemistry*. 27: 2397-2409.
- SRINIVAS B., GUPTA B.N. 1997. Rumen fermentation, bacterial and total volatile fatty acid (TVFA) production rates in cattle fed on urea-molasses-mineral block licks supplement. *Animal Feed Science and Technology*. 65: 275-286.
- STAFFORD H.A. 1988. Proanthocyanidins and the lignin connection. *Phytochemistry*. 27: 1-6.
- STANDING COMMITTEE ON AGRICULTURE(SCA). 1990. *Ruminants. Feeding Standards for Australian Livestock*. East Melbourne: CSIRO Publications, Australia.
- STANLEY R.W., KESLER E.M. 1959. Preparation and some basic properties of cell-free cellulolytic extracts of rumen fluid. *Journal of Dairy Science*. 42: 127-
- STATLER D.G. 1970. Resistance of bean plants to *Fusarium solani* f. *phaseoli*. *Plant Disease Reporter*. 54: 698-699.
- STERN M.D., HOOVER W.H., LEONARD J.B. 1977b. Ultrastructure of rumen holotrichs by electron microscopy. *Journal of Dairy Science*. 60: 911-
- STERN M.D., HOOVER W.H., SNIFFEN C.J., CROOKER B.A., KNOWLTON P.H. 1978. Effects of non-structural carbohydrate, urea and soluble protein levels on microbial protein synthesis in continuous culture of rumen contents. *Journal of Animal Science*. 47: 944-
- STERN M.D., HOOVER W.H., SUMMERS JR R.G., RITTENBURG J.H. 1977a. Ultrastructure of rumen entodiniomorphs by electron microscopy. *Journal of Dairy Science*. 60: 902.

- 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.
- STERN M.D., WINDSCHITL P.M., WONG W.J. 1986. The simultaneous use of diaminopimelic acid and purines as markers for estimating ruminal bacteria protein synthesis and degradation in continuous culture. Page 14 En: *Proc. Comp. Aspects Physiol. Digestion in Ruminant*. Cornell Univ., Ithaca, NY.
- STEVANI J., BEAUMATIN PH., DUMAY C., HANNEQUART G., DURAND M. 1988. Etude en fermenteur semi-continu de l'influence de l'addition de sulfate sur la dégradation des constituants pariétaux d'une paille non traitée ou traitée à la soude. *Reproduction, Nutrition, Development*. (à paraître).
- STEWART C.S. 1977. Factors affecting cellulolytic activity of rumen contents. *Applied and Environmental Microbiology*. 33: 497-502.
- STEWART C.S., BRYANT M.P. 1989. The rumen bacteria. En: *The Rumen Microbial Ecosystem* (Eds: Hobson P.N., Wallace R.J.). Elsevier Applied Science, London, pp.21-76.
- STEWART C.S., DINSDALE D., CHENG K.J., PANIAGUA C. 1979. The digestion of straw in the rumen. En: *Straw decay and its effect on disposal and utilization*. pp. 123-132. (Ed: E. Grossbard). Willey-Interscience Publications.
- STOKES J.R., HOOVER W.H., MILLER T.K., BLAUWEIKEL R. 1991b. Ruminant digestion and microbial utilization of diets varying in type of carbohydrate and protein. *Journal of Dairy Science*. 74: 871-881.
- STOKES S.R., HOOVER W.H., MILLER T.K., MANSKI R.P. 1991a. Impact of carbohydrate and protein levels on bacterial metabolism in continuous culture. *Journal of Dairy Science*. 74: 860-870.
- STORM E., ØRSKOV E.R. 1983a. The nutritive value of rumen microorganisms in ruminants. 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen microorganisms. *British Journal of Nutrition*. 50: 463-470.
- STOUTHAMER A.H., BETTENHAUSSEN C. 1973. Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms. *ACTA Biochimica et Biophysica* 301: 53-.
- SUDANA I.B., LENG R.A. 1986. Effect of supplementing a wheat straw based diet with urea or a urea-molasses block and/or cotton seed meal on intake and live weight change of lambs. *Animal Feed Science and Technology*. 16: 25-35.

- SUSMEL P., ANTONGIOVANI M., STEFANON B., MILLS C.R., HINDLE V.A., VAN VUUREN A.M. 1994. Biological and chemical assessment of feed protein before and after rumen exposure. *Animal Feed Science and Technology*. 49: 119-132.
- SUTTON J.D., KNIGHT R., MCALLAN A.B., SMITH R.H. 1983. Digestion and synthesis in the rumen of sheep given diets supplemented with free and protected oils. *British Journal of Nutrition*. 49: 419-427.
- SYNGE R.L.M. 1953. Note on the currence of diaminopimelic acid in some intestinal micro-organisms from farm animals. *Journal of General Microbiology*. 9: 407-
- TAGARI H, BEN GHEDALIA D, STHERN Y. 1965. Effect of carob pod extract on cellulolysis, proteolysis, deamination and protein synthesis in an artificial rumen. *Applied of Microbiology*. 13: 437-442.
- TAMADA T. 1973. Feed utilization and anatomical adaptation of kids after removal of compartments of forestomach or omasal laminae. *Journal of Dairy Science*. 56:473-
- TAS M.V., EVANS R.A., OXFORD R.F.E. 1981. The digestibility of amino acids in the small intestine of the sheep. *British Journal of Nutrition*. 45: 167-174.
- TEAGUE W.R. 1989. The rate of consumftion of bush and grass by goats in a representative *Acacia karroo* savanna community in the eastern cape. *Journal Grassl. Soc. South. Afr.* 6: 8-13.
- TEATHER R.M., SAUER F.D. 1988. A naturally compartmented rumen simulation system for the continous culture of rumen bacteria and protozoa. *Journal of Dairy Science*. 71: 666-673.
- TEJIDO M.L., RANILLA M.J., CARRO M.D. 2002. *In vitro* digestibility of forages as influenced by source of inoculum (sheep rumen versus Rusitec fermenters) and diet of the donor sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 97: 41-51.
- TERRILL T.H., ROWAN A.M., DOUGLAS G.B., BARRY T.N. 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 58: 321-329.
- TERRILL T.H., WAGHORN G.C., WOOLLEY D.J., MCNABB W.C., BARRY T.N. 1994. Assay and Digestion of ¹⁴C-labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. *British Journal of Nutrition*. 72: 467-477.
- THERIEZ M., BOULE G. 1970. Valeur alimentaire du tourteau d'olive. *Annales de Zootechnie*. 19: 143-148.

- THORLEY C. M., SHARPE M.E., BRYANT M. P. 1968. Modifications of the rumen bacterial flora by feeding cattle ground and pelleted roughage as determined with culture media with and without rumen fluid. *Journal of Dairy Science*. 51: 1811-1816.
- TITUS C.H., PROVENZA F.D., PEREVOLOTSKY A., SILANIKOVE N., ROGOSIC J. 2001. Supplemental polyethylene glycol influences preferences of goats browsing blackbrush. *Journal of Range Management*. 54: 161-165.
- TJAKRADIDJAJA A.S. BROOKER J.D., BOTTEMA C.D.K. 1997. Are *Streptococcus caprinus* and *Selonomonas ruminantium* K2 the only tannin-resistant bacteria in feral ruminants? *Microbiology Australia*, 18: A114(PO4.5).
- TSAI C.G., GATES D.M., INGLEDEW W.M., JONES G.A. 1976. Products of anaerobic phloroglucinol degradation by *Coprococcus* sp. Pe₁₅. *Canadian Journal of Microbiology*. 22:159-164.
- UBALDI A., PICCHI S., FIORUCCI F., CATALI G., COZZANI R. 1995. Determinazione degli acidi gras volatili negli insilati. *Técnica Molitoria Nov*. 1176-1180.
- ULYATT M.J., MACRAE J.C., CLARKE T.J., PEARCE P.D. 1975. Quantitative digestion of fresh herbage by sheep. IV. Protein synthesis in the Stomach. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. 84: 453-.
- USHIDA K., LASSALAS B., JOUANY J.P. 1985. Determination of assay parameters for RNA análisis in bacteria and duodenal samples by spectrophotometry. Influence of sample treatment and preservation. *Reproductive Nutrition Development*. 25: 1037-1046.
- VALDEZ F.R., BUSH., GOETSCH A.L., OWENS F.N. 1986. Effect of steroidal sapogenins on ruminal fermentation and on production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 69: 1568-1575.
- VAN BUREN J.P., ROBINSON W.B. 1969. Formation of complexes between protein and tannic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 17: 772-777.
- VAN GYLSWYK N.O., SCHWARTZ H.M. 1984. Microbial ecology of the rumen of animal fed high-fibre diets. En: *Herbivores Nutrition in the Subtropics and Tropics*. pp. 359-377. (Eds: F.M.C. Gilchrist and R.I. Mackie). The Science Press, Pretoria.
- VAN HOUTERT M.F.J. 1993. The production and metabolism of volatile fatty acids by ruminants fed roughages: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 43: 189-225.
- VAN HOVEN W., FURSTENBURG D. 1992. The use of purified condensed tannins as a reference in determining its influence on rumen fermentation. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 101A: 381-385.

- VAN SOEST P.J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant, 2nd Edition. Cornell University Press, Ithaca.
- VAN STRAALLEN W.M., DOOPER F.M.H., ANTONIEWICZ A.M., KOSMALA I., VAN VUUREN. 1993. Intestinal digestibility in dairy cows of protein from grass and clover measured with mobile bag and other methods. *Journal of Dairy Science*. 76: 2970-2981.
- VANHATALO A., DAKOWSKI P., HUHTANEN P. 1996. Effects of stage of growth and duration of rumen incubation time on intestinal digestibility of rumen-undegradable nitrogen of grass by the mobile bag method in cows. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A, Animal Science*. 46: 1-10.
- VANZANT E.S., COCHRAN R.C., TITGEMEYER E.C., STAFFORD S.D., OLSON K.C., JOHNSON D.E., JEAN G.ST. 1996. *In vivo* and in situ measurements of forage protein degradation in beef cattle. *Journal of Animal Science*. 74: 2773-2784.
- VARVIKKO T., LINDBERG J. 1985. Estimation of microbial nitrogen in nylon-bag residues by feed ¹⁵N dilution. *British Journal of Nutrition*. 54: 473-482.
- VELDKAMP H. 1976. Continuous culture in microbial physiology and ecology. Meadowfield Press Ltd., Durham, UK, 62 pp.
- VERA A. 1990. Relaciones entre la eficiencia de las operaciones de aprovechamiento de las hojas de olivo y su utilización en la alimentación de rumiantes. *AYMA*. 30: 203-215.
- VIERA D.M. 1986. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. *Journal of Animal Science*. 63: 1547-1560.
- VILLALABA J.J., PROVENZA F.D. 1996. preference for flavoured wheat straw by lambs conditioned with intraruminal administrations of sodium propionate. *Journal of Animal Science*. 74: 2362-2368.
- VILLALABA J.J., PROVENZA F.D. 1997a. Preference for flavoured wheat straw by lambs conditioned with intraruminal infusions of acetate and propionate. *Journal of Animal Science*. 75: 2905-2914.
- VILLALABA J.J., PROVENZA F.D. 1997b. Preference for flavoured foods by lambs conditioned with intraruminal administration of nitrogen. *British Journal of Nutrition*. 78: 545-561.
- VILLALABA J.J., PROVENZA F.D. 1997c. Preference for wheat straw by lambs conditioned with intraruminal infusions of starch. *British Journal of Nutrition*. 77: 287-297.

- VILLALABA J.J., PROVENZA F.D. 1999. Nutrient-specific preferences by lambs conditioned with intraruminal infusions of starch, casein, and water. *Journal of Animal Science*. 77:378-387.
- VOIGT J., PIATKOWSKI B., ENGELMANN H., RUDOLPH E. 1985. Measurement of the postruminal digestibility of crude protein by the bag technique in cows. *Archiv für Tierernährung*. 35: 555-562.
- VOLDEN H., HARSTAD O.M. 1994. Effect of rumen incubation on true indigestibility of feed protein in the digestive tract determined by nylon bag techniques. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A, Animal Science*. 45: 106-115.
- VOLDEN H., HARSTAD O.M. 1998. Amino acid composition of bacteria harvested from the rumen of dairy cows fed three diets differing in protein content and rumen protein degradability at two levels of intake. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A, Animal Science*. 48: 210-215.
- WAGHORN G.C., SHELTON I.D. 1995. Effect of condensed tannins in *lotus pedunculatus* value of ryegrass (*Lolium perenne*) fed to sheep. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 125: 291-297.
- WAGHORN G.C., SHELTON I.D., McNABB W.C., MCCUTCHEON S.N. 1994b. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* its nutritive value for sheep. 2. Nitrogenous aspects. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 123: 109-119.
- WAGHORN G.C., ULYATT M.J., JOHN A., FISHER M.T. 1987b. The effect of condensed tannins on the site of digestion of aminoacids and other nutrients in sheep fed *Lotus corniculatus L.* *British Journal of Nutrition*. 57: 115-126.
- WALKER D.J., EGAN A.R., NADER C.J., ULYATT M.J., STORER G.B. 1975. Rumen microbial protein synthesis and proportions of microbial and non-microbial nitrogen flowing to the intestines of sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*. 26: 699-.
- WALKER D.J., HOPGOOD M.F. 1961. The hydrolysis of wheat hay hemicellulose by a purified enzyme from the rumen microorganisms. *Australian Journal of Agricultural Research*. 12:651-
- WALLACE R.J. 1991. Rumen proteolysis and its control. En: *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*. (Ed: J.P. Jouany), Pp.131-150. INRA, Paris.
- WALLACE R.J., ATASOGLU C., NEWBOLD C.J. 1999. Role of peptides in rumen microbial metabolism. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 12: 139-147.

- WALLACE R.J., COTTA M.A. 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. En: *The Rumen Microbial Ecosystem* (Ed. P.N. Hobson). Elsevier Applied Science. UK. pp: 217-249.
- WALLACE R.J., CHENG K.J., CZERKAWSKI J.W. 1980. Effect of monensin on fermentation characteristics of the artificial rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 40: 672-674.
- WANDERLEY R.C., THEURER C.B., POORE M. 1987. Doudenal bacterial and nonbacterial protein supply in steers fed forage and grain diets. *Journal of Animal Science*. 64: 295-302.
- WANG Y., DOUGLAS G.B., WAGHORN G.C., BARRY T.N., FOOTE A.G. 1996b. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon lactation performance in ewes. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 126: 353-362.
- WANG Y., DOUGLAS G.B., WAGHORN G.C., BARRY T.N., FOOTE A.G., PURCHAS R.W. 1996a. Effect of condensed tannins upon the performance of lambs grazing *lotus corniculatus* and Lucerne (*Medicago sativa*). *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 126: 87-98.
- WANG Y., WAGHORN G.C., McNABB W.C., BARRY T.N., HEDLEY M.J., SHELTON I.D. 1996c. Effects of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon the digestion of methionine and cysteine in the small intestine of sheep. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 127: 413-421.
- WARNER A.C.I. 1962. Enumeration of microorganisms. *Journal of General Microbiology*. 28:119-128.
- WARNER A.C.I. 1966. Diurnal changes in the concentration of microorganisms in the rumen of sheep fed limited diets once daily. *Journal of General Microbiology*. 45: 213-235.
- WATSON C., NORTON B.W. 1982. The utilization of pangola grass hay by sheep and angora goats. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*. 14: 460-470.
- WEAKLEY D.C., STERN M.D., SATTER L.D. 1983. Factors affecting disappearance of feedstuffs from bags suspended in the rumen. *Journal of Animal Science*. 56: 493-507.
- WEATHERBURN M.W. 1967. Phenol hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*. 39: 971-974.
- WEBSTER A.J.F. 1987 Metabolizable protein. En: *Feed Evaluation and Protein Requirement System for Ruminant*. pp: 47-53.
- WEISBJERG M.R., HVELPLUND T. 1993. Estimation of net energy content (FU) in feeds for cattle (in Danish). Forskningsrapport no 3. *The National Institute of Animal Science*. 39 pp.

- WEISBJERG M.R., HVELPLUND T., HELLBERG S., OLSSON S., SANNE S. 1996b. Effective rumen degradability and intestinal digestibility of individual amino acids in different concentrates determined *in situ*. *Animal Feed Science and Technology*. 62: 179-188.
- WEISS W.P. 1994. Estimation of digestibility of forages by laboratory methods. En: *Forage Quality, Evaluation and Utilisation*. (Ed: Fahey Jr G.C.). American Society of Agronomy Inc., Madison, Wisconsin, pp. 644-681.
- WELLER R.A., GRAY F.V., PILGRIM A.F. 1958. The conversion of plant nitrogen to microbial nitrogen in the rumen of the sheep. *British Journal of Nutrition*. 12: 421.
- WELLER R.A., GRAY F.V., PILGRIM A.F., JONES G.B. 1967. The rates of production of volatile fatty acids in the rumen. IV. Individual and total volatile fatty acids. *Australian Journal of Agricultural research*. 18: 107-
- WELLER R.A., PILGRIM A.F. 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of the sheep and from a continuous *in vitro* fermentation system. *British Journal of Nutrition*. 32: 341-351.
- WELLER R.A., PILGRIM A.F. 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of the sheep and from a continuous *in vitro* fermentation system. *British Journal of Nutrition*. 32: 341-351.
- 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 solid. *Journal of Animal Science*. 72: 1335-1343.
- WILLIAMS A.G. 1986. Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiological Reviews*. 51: 25-49.
- WILLIAMS A.G., COLEMAN G.S. 1988. The rumen Protozoa. En: (Ed: P.N. Hobson). *The Rumen Microbial Ecosystem*, pp. 77-128. Elsevier Applied Science. England. U.K
- WILLIAMS A.G., COLEMAN G.S. 1989. The rumen protozoa. En: *The Rumen Microbial Ecosystem* (Eds: Hobson P.N., Wallace R.J.). Elsevier Applied Science, London, pp. 77-128.
- WOJCIECHOWIEZ J., HEINRICOVA K., ZIOLECK A. 1982. An exopectate lyase of *Butyrivibrio fibrisolvens* from the bovine rumen. *Journal of General Microbiology*. 128: 2661-2665.
- WOLIN M.J. 1979. The rumen fermentation: a model for microbial interactions in anaerobic ecosystems. En: *Advances in Microbial Ecology*. (Ed: Alexander M.) Vol. 3. Plenum Press, New York, pp. 49-77.

- WONG E. 1973. Plant phenolics. In: *Chemistry and Biochemistry of Herbage*. Vol. 1. pp: 265-322. Eds.: G.W. Butler and R.W. Bailey. Academic Press. London.
- WONG E. 1973. Plants phenolics. En: *Chemistry and Biochemistry of Herbage*. (Eds: Butler G.W., Bailey R.W.) Academic Press. London. Vol. 1. pp: 265-322..
- WORK E. 1950. A new naturally occurring amino-acid. *Nature* (Lond). 165: 74.
- WORK E., DEWEY D.L. 1953. The distribution of Diaminopimelic acid among various microorganism. *Journal of General Microbiology*. 9: 394-409.
- YANG W.Z., BEAUCHEMIN K.A., KOENING K.M., RODE L.M. 1997. Comparison of hull-less barley, barley, or corn for lactating cows: Effects on extent of digestion and milk production. *Journal of Dairy Science*. 80: 2475-2486.
- YANG W.Z., BEAUCHEMIN K.A., RODE L.M. 2001. Effect of dietary factors on distribution and chemical composition of liquid- or solid- associated bacterial populations in the rumen of dairy cows. *Journal of Animal Science*. 79: 2736-2746.
- 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*, Universidad de Córdoba. 281 pgs.
- ZELAYA J.C. 1994. Degradación ruminal de las bases púricas de origen alimentario. *Tesis-Master of Science*. Instituto Agronómico Mediterraneo de Zaragoza.
- ZINN R.A., OWENS F.N. 1982. rapid procedure for quantifying nucleic acid content of digesta. En: *Protein requirements for cattle, symposium* (ed. F.N. Owens), pp.26-30 Oklahoma State Univ., Stillwater.
- ZINN R.A., OWENS F.N. 1983. Influence of feed intake level on site of digestion in steers fed a high concentrate diet. *Journal of Animal Science*. 56: 471-475.
- 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.