

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA



**EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN Y LA
MICROBIOTA RUMINAL PROMOVIDAS POR DIETAS
CONVENCIONALES Y NO CONVENCIONALES EN
CAPRINO Y EN SISTEMAS *IN VITRO***



EVA CRISTINA SOTO MARTIN

Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal
Estación Experimental del Zaidín (CSIC)
Granada, 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Eva Cristina Soto Martín
D.L.: GR 673-2012
ISBN: 978-84-694-6369-7

Fotografías de la portada:

“Flor de la alfalfa”: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/brooks_kels/

“Destríos de tomate y pepino en planta de compostaje de residuos vegetales”: foto de la autora.

“Interior de un invernadero”: <http://grandsolarpower.com/indoorgreenhouse/>

“Espiga de cebada”: <http://www.inforural.com.mx/spip.php?article14072>

Fotografías de la contraportada:

“Choto”: foto de la autora

“Tubo de ensayo *Hungate*”: <http://www.hellopro.fr/septum-pour-tube-hungate-2006801-446225-produit.html>

Este trabajo se ha realizado en el marco de los Proyectos de Investigación CICYT-FEDER (AGL 2004-04755-CO2-02/GAN), JUNTA DE ANDALUCÍA (PO5-AGR-00408), Intramural CSIC (200740I021) y Marie Curie Actions (FP7-PEOPLE-2007-2-2-ERG-224816). La Licenciada Eva Cristina Soto Martín ha disfrutado de una beca-contrato I3P concedida por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas para el periodo 2007-2010.

Los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral titulada “Evaluación de la fermentación y la microbiota ruminal promovidas por dietas convencionales y no convencionales en caprino y en sistemas *in vitro*” han sido realizados bajo nuestra dirección por la Licenciada Eva Cristina Soto Martín para aspirar al grado de Doctora. Esta memoria refleja fielmente los resultados obtenidos.

Dra. Eduarda Molina Alcaide

Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal

Estación Experimental del Zaidín (CSIC)

Granada

Dr. David Rafael Yáñez Ruiz

Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal

Estación Experimental del Zaidín (CSIC)

Granada

Licenciada Eva Cristina Soto Martín

Granada 2011

Parte de los resultados que se presentan en esta Memoria de Tesis Doctoral se recogen en los siguientes trabajos:

- **Soto, E. C.**, Yáñez-Ruiz, D. R., Cantalapiedra-Hijar, G., Vivas, A., Martín-García, A. I., Molina-Alcaide, E. 2008. Evolution of microbial communities in the rumen of goats and in single-flow continuous culture fermenters during adaptation to diet. En: *Gut Microbiome. Functionality, interaction with the host and impact on the environment. 6th INRA-RRI Symposium*. Clermont-Ferrand, Francia. 18-20 Junio.

- **Soto, E. C.**, Molina-Alcaide, E., Khelil, H., Yáñez-Ruiz, D.R. 2009. Estudio de las poblaciones microbianas desarrolladas en un sistema de cultivo *in vitro* no renovado con dietas que incluyen subproductos de invernadero como sustitutivo de la cebada. En: *XIII Jornadas sobre Producción Animal*. II, pp. 766-768. ISBN: 978-84-613-2311-1. Ed. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario. Zaragoza.

- **Soto, E. C.**, Yáñez-Ruiz, D. R., Cantalapiedra-Hijar, G., Khelil, H., Molina-Alcaide, E. 2010. Comparative study of microbial profiles in fermenters content and effluents from a single-flow continuous-culture system. En: *Gut Microbiology: new insights into gut microbial ecosystems. 7th RRI-INRA Symposium*. Aberdeen, Reino Unido. 23-25 Junio.

- **Soto, E. C.**, Yáñez-Ruiz, D. R., Khelil, H., Molina-Alcaide, E. 2011. An *in vitro* evaluation of the potential use of greenhouse wastes to replace barley in goats' diets. *Options Méditerranéennes*, en prensa.

AGRADECIMIENTOS

Una vez llegado el final de esta etapa, y a pesar de los momentos de flaqueza, yo también puedo decir que lo conseguí. Pero la consecución de este trabajo no habría sido posible sin la ayuda de muchas personas, colaboradores directos o indirectos y que, de formas diferentes, han incidido en el devenir del mismo. A todos ellos, quiero dar las gracias profundamente.

A Eduarda Molina, mi directora de trabajo, por "darme la alternativa" en el mundo de la investigación y por su gran dedicación, en todo lugar y momento. A David Yáñez, también director de esta tesis, por confiar siempre en mi criterio y habilidades experimentales. A ambos, por creer en mis posibilidades, por contribuir enormemente al crecimiento de esta persona y "proyecto de científica", por darme apoyo y cuidar de mi cuando lo he necesitado.

Al programa de becas predoctorales I3P (ahora JAE predoctorales) del CSIC por haberme concedido una ayuda económica para la realización de este trabajo.

A Julia, Víctor, Isa y Tamara, mis maestras y maestro en el laboratorio, por su colaboración imprescindible en todos los ensayos y análisis que componen esta tesis, por compartir frustraciones, cotidianas en la investigación, y trucos diversos, por brindarme su amistad. A los demás técnicos y prácticos que, en numerosas ocasiones, han prestado sus manos y buena disposición, en especial a Nuria y a Ana.

A Gonzalo Cantalapiedra por legarme parte de su trabajo, por su valiosa ayuda con ciertos "trámites burocráticos" y algunos de los análisis más complicados. A Hajer, con la que compartí parte de los ensayos in vitro de esta tesis, por ser además amiga, por derribar muchos estereotipos. A Manolo y Gonzalo Martínez, por su sentido del compañerismo y de la generosidad, por tener siempre una "chispa de alegría" para regalar. A Ignacio Martín, por su optimismo y fortaleza.

A Eva Ramos y Leti, mis "Pepitos Grillo", por vuestro apoyo, sabios consejos y asesoramiento científico y no científico, en especial en la dura recta final. A Pablo, por compartir "sabiduría diversa" y momentos hilarantes.

A Luis Lara y Alejandro por rescatarme de más de un problema estadístico e informático, por la instrucción tan útil para dar formato a esta tesis. A Rafa Hueso y Juan Vera, los "MacGyver" del departamento, por hacer que todo funcione siempre que se necesita. A Paco Funes, por cuidar tan bien de las cabritas.

A los demás compañeros del departamento, en especial a Arancha, Jose, Lucre, M^a Luz, Bea y Alicia, por hacer de la "sala de becarios" un lugar especial, por agrandar mi conocimiento no científico, por todas las tertulias filosóficas y mundanas, por los fantásticos momentos compartidos.

Al grupo de investigación de Rogelio Nogales por prestarme su ayuda, laboratorio y equipos. A Remedios Sanz por su generosa contribución a la subvención de parte de los análisis. A Paqui Gil por su buena mano para lidiar con los problemas burocráticos.

A los miembros del departamento "Animal Health, Welfare and Nutrition" del "Research Center Foulum" de la Universidad de Aarhus, en especial a Nuria Canibe, y familia, por hacerme sentir como en casa. A los estudiantes de "Foulum", del "Nørresø Kollegiet" y de Viborg, por hacerme partícipe de la calidez de los "latinos escandinavos". A María, Kjel, Dagmara, Ngoni y Anny, por los momentos inolvidables compartidos, por hacer posible lo imposible: hacerme llorar de vuelta a España.

Al grupo de investigación "Microbial Ecology" del "Rowett Research Institute" de la Universidad de Aberdeen, en especial a Harry J. Flint y Sylvia H. Duncan. A Álvaro Belenguer, por ayudar a hacer posible mi estancia en Escocia, por ser mi anfitrión de laboratorio cuando más perdida estaba. A la pequeña colonia andaluza de Aberdeen- Eva, David, Cristina y Antonio- por mimarme tanto; y a los estudiantes, "the Rowett gang" (Maša, Mireia, Luz, Ray, Anna, Dinesh, ...), por su amistad más allá del espacio y el tiempo. A Alex, por enseñarme un trocito de Escocia, por compartir charlas y tazas de té.

A mis amigas y amigos de siempre, en especial a Ana B. y M^a Celes, por su amistad incondicional. A Jorge, por todo lo compartido en este tiempo.

A mi familia- mis hermanas, mi hermano y mi madre- que, con su duro esfuerzo, han contribuido, en gran medida, a hacer de mi lo que soy, y que han creído siempre en mis posibilidades más que yo misma.

Todos aquellos que han realizado una tesis doctoral saben que no siempre se tiene la fortuna de obtener los mejores resultados o enunciar las mejores conclusiones, y que, durante la redacción de la misma, pocas veces las musas te acompañan, encontrándose la inspiración casi siempre en la lectura de decenas de trabajos. Sin embargo, después de los experimentos exitosos y los fallidos, los resultados buenos y "no tan buenos", me quedo con esta reflexión:

"Es mejor saber después de haber pensado y discutido que aceptar los saberes que nadie discute para no tener que pensar"

Fernando Sabater

Creo que una hoja de hierba, no es menos
que el día de trabajo de las estrellas,
y que una hormiga es perfecta,
y un grano de arena,
y el huevo del régulo,
son igualmente perfectos,
y que la rana es una obra maestra,
digna de los señalados,
y que la zarzamora podría adornar,
los salones del paraíso,
y que la articulación más pequeña de mi mano,
avergüenza a las máquinas,
y que la vaca que pasta, con su cabeza gacha,
supera todas las estatuas,
y que un ratón es milagro suficiente,
como para hacer dudar,
a seis trillones de infieles
(...)

Walt Whitman (*Song of myself*, traducción de León Felipe)

A mi madre, mis hermanas y hermano

A la memoria de mi padre

INDICE GENERAL

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
Introduction and objectives	7
Capítulo 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. EL ANIMAL RUMIANTE	13
2.1.1. Importancia ecológica	13
2.1.2. Fermentación microbiana en el rumen.....	14
2.2. EL ECOSISTEMA RUMINAL.....	15
2.2.1. Introducción	15
2.2.2. Bacterias	17
2.2.3. Arqueas.....	18
2.2.4. Protozoos.....	19
2.2.5. Hongos	21
2.2.6. Virus.....	22
2.2.7. Degradación de nutrientes en el rumen	23
2.2.7.1. Degradación de los polímeros de la pared celular.....	23
2.2.7.2. Microorganismos productores de metano.....	27
2.2.8. Compartimentación en el rumen.....	27
2.2.9. Factores que determinan el asentamiento y la evolución de la microbiota ruminal.....	30
2.2.9.1. Variabilidad entre animales: efecto del hospedador.....	31
2.2.9.2. Variaciones circadianas en la microbiota ruminal	33
2.2.9.3. pH ruminal y dieta	34
2.2.9.4. Interacciones microbianas	37
2.3. SISTEMAS DE SIMULACIÓN DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL.....	41
2.3.1. Tipos y aplicaciones de los sistemas de simulación.....	41
2.3.2. Determinación de la digestibilidad <i>in vitro</i>	43
2.3.3. Determinación de la degradabilidad y de los parámetros de la fermentación ruminal	45
2.3.3.1. Cultivos no renovados de microorganismos ruminales.....	45
2.3.3.2. Fermentadores de flujo continuo	47
2.3.4. Poblaciones microbianas en los sistemas <i>in vitro</i>	49
2.3.5. Fuentes de variación en los sistemas de fermentación <i>in vitro</i>	52
2.3.5.1. Duración del periodo de incubación y adaptación a las condiciones <i>in vitro</i>	52
2.3.5.2. Inóculo ruminal.....	54
2.4. METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE LA MICROBIOTA RUMINAL.....	56
2.4.1. Técnicas basadas en el cultivo de microorganismos.....	56
2.4.2. Técnicas basadas en la caracterización de genes marcadores	57
2.4.2.1. Taxonomía filogenética.....	57
2.4.2.2. Métodos de caracterización de la diversidad microbiana	59
2.4.2.3. Ventajas y limitaciones de DGGE y T-RFLP	65
2.4.2.4. Análisis multivariante de datos en ecología microbiana	69
2.4.2.5. Cuantificación de grupos microbianos: PCR en tiempo real	71

2.5. EL SECTOR CAPRINO.....	74
2.5.1. Importancia socioeconómica, censos y sistemas de producción	74
2.5.2. Fluctuación en el precio de los cereales e impacto en la producción caprina.Fuentes de nutrientes alternativas	76
Capítulo 3. MATERIAL Y MÉTODOS	81
3.1. DIETAS.....	83
3.2. ANIMALES	84
3.3. SISTEMAS <i>IN VITRO</i>	85
3.3.1. Incubador para la determinación de la digestibilidad <i>in vitro</i>	85
3.3.2. Cultivos no renovados de microorganismos ruminales (CNRMR)	86
3.3.3. Fermentadores de flujo continuo simple (FFCS)	87
3.4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	89
3.4.1. Experimento 1: Estudio de la variabilidad individual de la comunidad bacteriana ruminal de cabras y de la persistencia de esta variabilidad tras intercambiar contenido ruminal entre animales.....	89
3.4.2. Experimento 2: Estudio de la evolución de las concentraciones de bacterias, arqueas, hongos y bacterias celulolíticas, y de la diversidad y estructura de las poblaciones bacterianas durante la adaptación a las condiciones experimentales <i>in vitro</i> , en fermentadores de flujo continuo simple inoculados con líquido ruminal de cabras	89
3.4.3. Experimento 3: Estudio de la microbiota desarrollada en los frascos de incubación del sistema Daisy ^{II} durante la determinación de la digestibilidad de una serie de materias primas.....	90
3.4.4. Experimento 4: Estudio del efecto de la sustitución de cebada por destríos de invernaderos (tomate y pepino) sobre la fermentación ruminal en cultivos no renovados de microorganismos ruminales.....	91
3.4.5. Experimento 5: Estudio del efecto de la sustitución de cebada por destríos de invernaderos (tomate y pepino) sobre la fermentación ruminal y la microbiota en fermentadores de flujo continuo simple	92
3.5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS Y CÁLCULOS	94
3.5.1. Análisis de composición química.....	94
3.5.2. Construcción de las curvas de la cinética de producción de gas en los sistemas de cultivos no renovados de microorganismos ruminales.....	94
3.5.3. Digestibilidad de nutrientes en cultivos no renovados de microorganismos ruminales y en fermentadores de flujo continuo simple.....	95
3.5.4. Caracterización y cuantificación de los productos de la fermentación ruminal	96
3.5.4.1. Ácidos grasos volátiles (AGVs)	96
3.5.4.2. Nitrógeno amoniacal.....	96
3.5.4.3. Nitrógeno microbiano	97
3.5.5. Estudio de la microbiota ruminal	97
3.5.5.1. Extracción de ADN	97
3.5.5.2. Cuantificación de grupos microbianos: PCR en tiempo real (RT-qPCR)	98
3.5.5.3. Evaluación de la diversidad y estructura de las poblaciones bacterianas	101
3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	109

Capítulo 4. RESULTADOS.....	111
Publicación 1	113
Publicación 2	123
Publicación 3	155
Publicación 4	183
Capítulo 5. DISCUSIÓN GENERAL.....	211
5.1. VARIABILIDAD INDIVIDUAL DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS RUMINALES.....	214
5.2. EVALUACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS EN ESTUDIOS CON SISTEMAS <i>IN VITRO</i>	215
5.2.1. Impacto del procesado y trasvase del contenido del rumen a un sistema <i>in vitro</i> sobre la microbiota ruminal.....	215
5.2.2. Duración del periodo de adaptación en los sistemas <i>in vitro</i>	220
5.2.3. Evolución de las poblaciones microbianas en sistemas <i>in vitro</i> basados en cultivos renovados y no renovados de microorganismos ruminales.....	222
5.3. EFECTO DE LA DIETA SUMINISTRADA AL SISTEMA <i>IN VITRO</i> SOBRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS.....	225
5.4. POTENCIAL DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES PARA SUSTITUIR A LA CEBADA EN DIETAS PARA RUMIANTES	229
Capítulo 6. CONCLUSIONES.....	235
Conclusions	239
Capítulo 7. RESUMEN.....	241
Summary	249
Capítulo 8. BIBLIOGRAFÍA	253

LISTADO DE TABLAS

Tabla 3.1. Composición de la disolución tampón (medio de Goering y van Soest, 1970, sin tripticasa) empleada para el experimento realizado con CNRMR.....	87
Tabla 3.2. Protocolo de amplificación y generación de la curva de disociación utilizado en RT-qPCR.....	99
Tabla 3.3. Protocolo de amplificación utilizado para DGGE.	102
Tabla 3.4. Protocolo de amplificación empleado para T-RFLP.	104
Table 4.2.1. Chemical composition (g kg ⁻¹ dry matter) of alfalfa hay and concentrate	127
Table 4.2.2. PCR primers used for the molecular analyses.....	131
Table 4.2.3. Absolute abundances of total bacteria and relative abundances of <i>Fibrobacter succinogenes</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> , total fungi and methanogenic archaea in the rumen of goats and in single-flow continuous-culture fermenters one and seven days after inoculation.	137
Table 4.2.4. Bacterial OTUs richness, diversity (Shannon index) and Shannon evenness in the rumen of goats and in single-flow continuous-culture fermenters one and seven days after inoculation.....	138
Table 4.2.5. Analysis of similarities (ANOSIM) for groups based on the type of sample (rumen or fermenter content) and the type of diet (LC and HC)	142
Table 4.2.6. Predominant <i>HhaI</i> peaks in the different samples (rumen and fermenter contents) and assignment of compatible bacteria.....	143
Table 4.3.1. Ingredient composition (g/kg dry matter) of the control and experimental diets.....	161
Table 4.3.2. Chemical composition (g/kg dry matter) and <i>in vitro</i> digestibility (g/g) of diet ingredients.....	162
Table 4.3.3. PCR primers used for all the molecular analyses.....	167
Table 4.3.4. Changes in the microbial abundances between incubation times in the different experiments.....	170
Table 4.3.5. Bacterial diversity and evenness in Daisy ^{II} incubator, batch cultures of mixed rumen microorganisms (BCMRM) and single-flow continuous-culture fermenters (SFCCF).....	175
Table 4.4.1. Ingredient composition (g/kg dry matter) of the control and experimental diets.....	188
Table 4.4.2. Chemical composition (g/kg dry matter) and <i>in vitro</i> digestibility (g/g) of diet ingredients.....	193

Table 4.4.3. Average values of pH, ammonia, gas production, volatile fatty acids (VFA) and molar proportions, acetic:propionic ratio and apparent and true DM and NDF digestibility obtained in batch cultures after 24 hours of experimental diets incubation.	195
Table 4.4.4. Effect of the type of waste and its level of inclusion in the diet on average values of pH, ammonia concentration, gas production, volatile fatty acids (VFA) production and molar proportions, acetic:propionic ratio and dry matter (DM) and neutral detergent fiber (NDF) digestibility obtained in batch cultures after 24 hours of diets incubation.....	196
Table 4.4.5. Average values of pH, volatile fatty acids (VFA) production and molar proportions, acetic:propionic ratios, carbohydrate digestibility, true organic matter (OM) digestibility and efficiency of VFA production in single-flow continuous-culture fermenters fed the experimental diets	199
Table 4.4.6. Average values of nitrogen flow and degradation, composition of effluent bacteria and bacterial growth and its efficiency in single-flow continuous-culture fermenters fed the experimental diets	200
Tabla 5.1. Efecto de la dieta sobre las abundancias de bacterias totales, <i>Fibrobacter succinogenes</i> , <i>Ruminococcus flavefacienes</i> , hongos, arqueas metanogénicas y protozoos y la diversidad y homogeneidad de las poblaciones bacterianas en fermentadores de flujo continuo simple... ..	227

LISTADO DE FIGURAS

Imagen 2.1. Protozoos ciliados vistos al microscopio óptico.....	20
Imagen 2.2. Detalle de un esporangio fúngico que ha germinado a partir del micelio desarrollado en una partícula de fibra.	22
Imagen 2.3. Colonización fúngica de paja de trigo.....	24
Figura 2.1. Interacciones entre los microorganismos ruminales.....	38
Figura 2.2. Curvas de amplificación, generadas mediante RT-qPCR, de varias muestras de concentración conocida (en rojo) y de varias muestras problema (en verde, azul y rosa).	72
Figura 2.3. Recta patrón construida a partir de diluciones seriadas de una muestra de ADN molde de concentración conocida	73
Figura 2.4. Evolución de los precios de la cebada pienso, por semanas, desde mediados del año 2008 hasta inicios del año 2011	77
Figura 2.5. Fluctuaciones en el precio del tomate redondo liso en el periodo 2008-2010	79
Figura 3.1. Sistema de incubación Daisy ^{II} (ANKOM Technology).....	86
Figura 3.2. Medida de la presión y del volumen de gas en los frascos Wheaton.....	87
Figura 3.3. Frascos de fermentación de los FFCS.....	88
Figura 3. 4. Esquema del proceso de identificación bacteriana a partir de los datos obtenidos por la aplicación de la técnica T-RFLP.	108
Figure 4.1.1. Dendrogram illustrating the effect of animal (1, 2 and 3), sampling time (0, 2 and 4 hours) and day (d1 and d2) on total bacteria (16s rRNA gene) T-RFLP patterns in Period I.....	119
Figure 4.1.2. Dendrogram illustrating the effect of animal (1, 2 and 3), period (I, II and III) and sampling day (d1, d2) on total bacteria (16s rRNA gene) T-RFLP patterns	120
Figure 4.2.1. Diagram of the experimental schedule	127
Figure 4.2.2. Dendrograms from A) DGGE and B) T-RF profiles of the goats' rumen and fermenters.....	140
Figure 4.2.3. Multi-dimensional scaling plots of the A) sampling day and B) diet from I) DGGE and II) T-RFLP analyses.....	141
Figure 4.3.1. Evolution of microbial numbers in different <i>in vitro</i> systems: I)ANKOM Daisy ^{II} incubator; II) BCMRM; and III) fermenter vessels (day 4) and effluents (day 5) of SFCCF. Time 0 represents values found in the respective inoculum: buffered rumen liquor for ANKOM Daisy ^{II} incubator and BCMRM, and rumen liquor for SFCCF.....	172
Figure 4.3.2. Percentage of T-RFs found in: I) Daisy ^{II} jars after 48 hours; II) BCMRM after 24 hours and III) SFCCF after 4 and 5 days of incubation, which were equal to those found in the respective inocula.....	177

Figure 4.4.1. Gas production curves for control and diets including 5, 10, 15, 20 and 25% of A) tomato (T1, T2, T3, T4, T5), B) cucumber (C1, C2, C3, C4, C5) or C) a tomato:cucumber mixture (1:1) (TC1, TC2, TC3, TC4, TC5) incubated in batch cultures during 72 h.....	197
Figura 5.1. Abundancias de bacterias (Bac), <i>Fibrobacter succinogenes</i> (<i>F. succ</i>), <i>Ruminococcus flavefaciens</i> (<i>R.flav</i>), hongos (Hon), arqueas metanogénicas (Met) y protozoos (Prot) en las fracciones sólida y líquida de muestras del contenido ruminal de caprino, utilizadas para obtener los inóculos empleados en cultivos no renovados de microorganismos ruminales (CNRMR) y en fermentadores de flujo continuo simple (FFCS).	217

LISTADO DE ABREVIATURAS¹

ADF	<i>Acid detergent fiber</i>
ADL	<i>Acid detergent lignin</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGVs	Ácidos grasos volátiles
ANOSIM	<i>Analysis of similarities</i>
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosómico
BAL	Bacterias asociadas a líquido
BAS	Bacterias asociadas a sólido
BCFA	<i>Branched chain fatty acids</i>
BCMRM	<i>Batch cultures of mixed rumen microorganisms</i>
BE	Bacterias del efluente
BL	Blanco en CNRMR
BP	Bases púricas
C1	Dieta basada en la dieta C0 pero con un 20% de cebada y un 5% de tomate liofilizado
C2	Dieta basada en la dieta C0 pero con un 15% de cebada y un 10% de tomate liofilizado
C3	Dieta basada en la dieta C0 pero con un 10% de cebada y un 15% de tomate liofilizado
C4	Dieta basada en la dieta C0 pero con un 5% de cebada y un 20% de tomate liofilizado
C5	Dieta basada en la dieta C0 pero sin cebada y un 25% de tomate liofilizado
C20	Ver dieta C1
C60	Ver dieta C3
C100	Ver dieta C5
CHO	Carbohidratos / <i>carbohydrates</i>
CNRMR	Cultivos no renovados de microorganismos ruminales
C0	Dieta basada en paja de trigo (30%), cebada (25%), heno de alfalfa (22%), torta de girasol (15%) y harina de salvado de trigo (5%)
CP	<i>Crude protein</i>
DGGE	<i>Denaturant Gradient Gel Electrophoresis</i>
DM	<i>Dry matter</i>
DMD	<i>Dry matter digestibility</i>

¹ Abreviaturas más destacadas del texto.

EB	<i>Effluent bacteria</i>
EBS	<i>Efficiency of bacterial synthesis</i>
EE	Extracto etéreo / <i>ether extract</i>
FAD	Fibra ácido detergente
FFCS	Fermentadores de flujo continuo simple
FM	<i>Fresh matter</i>
FND	Fibra neutro detergente
FNM	Flujo de nitrógeno microbiano
FNNA	Flujo de nitrógeno no amoniacal
FRT	Fragmento de restricción terminal
G+C	Guanina más citosina
GE	<i>Gross energy</i>
HA	Heno de alfalfa
HC	Dieta basada en un 30% de heno de alfalfa y un 70% de concentrado
ITS1	<i>Internal Transcribed Spacer 1</i>
LAD	Lignina ácido detergente
LC	Dieta basada en un 70% de heno de alfalfa y un 30% de concentrado
LSU	<i>(Ribosomal) Large Subunit</i>
MF	Materia fresca
MiCA	<i>Microbial Community Analysis (website)</i>
MS	Materia seca
MO	Materia orgánica
NAN	<i>Non ammoniacal nitrogen</i>
NBE	Nitrógeno en las bacterias del efluente
NDF	<i>Neutral detergent fiber</i>
NEF	Nitrógeno en el efluente
NM-MDS	<i>Non-metric Multi Dimensional Scaling</i>
NNA	Nitrógeno no amoniacal
NSC	<i>Non structural carbohydrates</i>
OM	<i>Organic matter</i>
OMD	<i>Organic matter digestibility</i>
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
PAT	<i>T-RFLP Phylogenetic Assignment Tool (website)</i>
PB	<i>Purine bases</i>
RDP	<i>Ribosomal Database Project (website)</i>
rss	<i>ribosomal small subunit (gene)</i>
RT-qPCR	<i>Real Time PCR / PCR en tiempo real o cuantitativa</i>

S	Svedberg (unidad para el coeficiente de sedimentación de las partículas)
SFCCF	<i>Single-flow continuous-culture fermenters</i>
SSU	<i>(Ribosomal) Small SubUnit</i>
T1	Dieta basada en la dieta CO pero con un 20% de cebada y un 5% de pepino liofilizado
T2	Dieta basada en la dieta CO pero con un 15% de cebada y un 10% de pepino liofilizado
T3	Dieta basada en la dieta CO pero con un 10% de cebada y un 15% de pepino liofilizado
T4	Dieta basada en la dieta CO pero con un 5% de cebada y un 20% de pepino liofilizado
T5	Dieta basada en la dieta CO pero sin cebada y un 25% de pepino liofilizado
T20	Ver dieta T1
T60	Ver dieta T3
T100	Ver dieta T5
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TC1	Dieta basada en la dieta CO pero con un 20% de cebada y un 5% de una mezcla 1:1 tomate:pepino liofilizada
TC2	Dieta basada en la dieta CO pero con un 15% de cebada y un 10% de una mezcla 1:1 tomate:pepino liofilizada
TC3	Dieta basada en la dieta CO pero con un 10% de cebada y un 15% de una mezcla 1:1 tomate:pepino liofilizada
TC4	Dieta basada en la dieta CO pero con un 5% de cebada y un 20% de una mezcla 1:1 tomate:pepino liofilizada
TC5	Dieta basada en la dieta CO pero con sin cebada y un 25% de una mezcla 1:1 tomate:pepino liofilizada
TC20	Ver dieta TC1
TC60	Ver dieta TC3
TC100	Ver dieta TC5
T-RF	<i>Terminal Restriction Fragment</i>
T-RFLP	<i>Terminal Restriction Fragment Polimorphism</i>
U	Unidad de actividad enzimática
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
VFA	<i>Volatile fatty acids</i>
WL	Waste level (20, 40, 60, 80, 100%)
WT	Waste type (tomato, cucumber or tomato plus cucumber)

Capítulo 1

Introducción y objetivos

En el siglo XIX se empieza a considerar que los microorganismos no solo tienen un carácter patógeno sino que también pueden desempeñar un importante papel en procesos químicos fundamentales para distintos ecosistemas (suelos, aguas, rizosfera, plantas y animales). En esa época se inició el estudio de bacterias de diversos hábitats acuáticos. En el siglo XX, las contribuciones de Beijerinck y Winogradsky al conocimiento de las comunidades microbianas de ambientes marinos y edáficos impulsaron notablemente el despegue de la Ecología Microbiana (Madsen, 2008). Al igual que ocurre en otros ecosistemas, los procesos fermentativos que tienen lugar en el rumen no pueden comprenderse sin tener en cuenta a los microorganismos que viven en él. La fermentación que tiene lugar en el rumen condiciona, en gran medida, el aprovechamiento del alimento que ingiere el animal y determina el desarrollo de las estructuras corporales del mismo y la producción de leche (Dehority, 2003). El estudio de los microorganismos ruminales se inició hace más de 60 años con los trabajos de Robert Hungate, pionero en el estudio de la microbiota del tracto digestivo de insectos y del rumen de bóvidos y también responsable del desarrollo de metodologías para el cultivo de microorganismos anaeróbicos, empleadas hasta la actualidad (Chung y Bryant, 1997). A pesar de que desde entonces se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la microbiota ruminal, su complejidad, en cuanto a la composición en especies y fisiología, hace que su conocimiento esté todavía plagado de incertidumbres. El empleo de técnicas moleculares, basadas en la amplificación de secuencias marcadoras como el ADN-r 16S o el gen *mcrA*, ha mejorado notablemente el conocimiento de la composición de la comunidad microbiana ruminal, incluso de las especies no cultivables (Firkins *et al.*, 2008). No obstante, este tema sigue siendo muy complicado debido a múltiples factores que determinan una gran variabilidad en la microbiota ruminal.

Muchos de estos factores, aunque se desconocen en la actualidad, pueden estar relacionados con el propio animal hospedador (Ziemer *et al.*, 2000; Wallace, 2008). La especificidad de la microbiota gastrointestinal por el animal hospedador es un fenómeno descrito en animales vertebrados e invertebrados (Ley *et al.*, 2008). Algunos autores sostienen que las diferencias en la microbiota del tracto digestivo de distintos individuos, pertenecientes a la misma especie, son incluso mayores

que las que existen entre animales de especies diferentes (Ley *et al.*, 2008; Wallace, 2008). Ciertos estudios, realizados en el tracto digestivo de humanos y en el rumen, han puesto de manifiesto, también, que las especies predominantes en un individuo presentan una estabilidad temporal y una alta resistencia a ser desplazadas por microorganismos foráneos (Zoetendal *et al.*, 1998; Weimer *et al.*, 2010). Además, se ha observado una interacción entre sustancias producidas en el tracto digestivo del hospedador y los microorganismos que lo habitan. Dicha interacción se considera responsable de la distinta capacidad de respuesta del hospedador ante sustancias de diversa índole, incluidos compuestos tóxicos que llegan al tracto digestivo (Nicholson *et al.*, 2005). La información acerca de la variabilidad de la microbiota ruminal entre animales es muy escasa y deriva de trabajos realizados en ovino y vacuno (Weimer *et al.*, 2010; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010). Este fenómeno tiene unas importantes repercusiones prácticas, en relación a la eficiencia de la utilización digestiva de los nutrientes que el animal recibe con el alimento (Guan *et al.*, 2008; Hernandez-Sanabria *et al.*, 2010). Puesto que no existe información a este respecto en la especie caprina, uno de los objetivos planteados en el presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido **estudiar la variabilidad, entre animales, de la estructura de las poblaciones bacterianas ruminales de cabras así como la persistencia de estas diferencias incluso tras realizar un intercambio de contenido ruminal de unos animales a otros.**

El empleo de sistemas *in vitro* permite reducir la variabilidad inherente a los ensayos *in vivo*. Este tipo de sistemas permiten un control más estricto de determinadas variables que el que se logra en experimentos *in vivo*. Las técnicas de simulación son, además, muy útiles para solventar otras dificultades implícitas en los ensayos *in vivo*, tales como la laboriosidad y dificultad en el manejo de los animales, el elevado coste de los experimentos, aspectos éticos, etc. Diversos sistemas *in vitro* se han utilizado para la valoración nutritiva de alimentos convencionales y no convencionales (Soder *et al.*, 2007; Molina-Alcaide *et al.*, 2010a), en estudios de procesos básicos de la fermentación ruminal (Cotta y Russell, 1982; Fellner *et al.*, 1995) y también para evaluar el efecto de determinados aditivos (Kung *et al.*, 1997; Carro y Ranilla, 2003; Busquet *et al.*, 2005). La idoneidad de cualquier sistema de simulación *in vitro* como herramienta

experimental reside, en gran medida, en su capacidad para mantener una densidad y composición microbiana en niveles similares a los encontrados en el rumen (Warner, 1956; Davey *et al*, 1960; Ziemer *et al.*, 2000). Algunos trabajos, realizados con fermentadores de flujo continuo (Mansfield *et al.*, 1995; Ziemer *et al.*, 2000; Cantalapiedra-Hijar, 2009; Muetzel *et al.*, 2009) y semi-continuo (Rusitec, Martínez *et al.*, 2010b), han mostrado que las densidades bacterianas y la estructura de sus poblaciones en el rumen y en fermentadores difieren considerablemente. No obstante, pocos trabajos han abordado el estudio de los cambios temporales experimentados por la microbiota en sistemas *in vitro* (Slyter y Putnam, 1967; Prevot *et al.*, 1994; Ziemer *et al.*, 2000; Muetzel *et al.*, 2009) y, en general, son también pocos los trabajos que han monitorizado en los sistemas de simulación lo que sucede durante el periodo de adaptación a una determinada dieta (Cardozo *et al.*, 2004; Busquet *et al.*, 2005; Castillejos *et al.*, 2005, 2007; Martínez *et al.*, en prensa). Además, la información existente muestra una variabilidad considerable en lo referente a los tiempos de adaptación a emplear en los sistemas *in vitro* (Mansfield *et al.*, 1995; Carro *et al.*, 1999; Busquet *et al.*, 2005; Castillejos *et al.*, 2005; Molina-Alcaide *et al.*, 2009a, b; Martínez *et al.*, 2010a, b). Establecer el tiempo necesario para alcanzar la estabilidad de la comunidad microbiana que se desarrolla *in vitro* es esencial para conocer el momento adecuado en el que llevar a cabo la toma de las muestras requeridas para un determinado estudio. A ello se ha pretendido contribuir en este trabajo abordando el objetivo de **evaluar, en fermentadores de flujo continuo simple, la evolución temporal de las concentraciones de bacterias, arqueas, hongos y bacterias celulolíticas así como los cambios producidos en la diversidad y estructura de las poblaciones bacterianas durante un periodo de adaptación a las condiciones experimentales *in vitro* de 7 días.**

En la actualidad existen diversos tipos de sistemas de simulación *in vitro*, más o menos complejos, capaces de responder de forma diferente a las necesidades que se plantean en un estudio. Las técnicas de degradabilidad y de digestibilidad *in vitro* han sido ampliamente utilizadas para evaluar alimentos convencionales y no convencionales desde hace más de 50 años. Los sistemas *in vitro* que permiten cuantificar la producción del gas de fermentación, inicialmente desarrollados para

determinar la digestibilidad de alimentos convencionales, han mostrado también su potencial para estudiar la actividad de los microorganismos ruminales, el efecto de determinados aditivos, factores antinutritivos o de ciertas enzimas sobre la fermentación ruminal (Carro y Ranilla, 2003; Ammar *et al.*, 2004; Ungerfeld *et al.*, 2007; Giraldo *et al.*, 2008; Moya, 2011). Otras técnicas de simulación más complejas, como los fermentadores, resultan más adecuadas que los sistemas cerrados para simular la fermentación ruminal en periodos de tiempo prolongados (Busquet *et al.*, 2005). Sin embargo, hasta el momento, la evaluación de estos sistemas en cuanto a la microbiota que sustentan es insuficiente para poder entender su potencialidad y, por consiguiente, para optimizar su uso. No existe prácticamente información acerca de la microbiota que se desarrolla en los distintos sistemas *in vitro* y de la similitud o divergencia entre ésta y la del compartimento líquido del contenido ruminal. Por ello, otro de los objetivos que se abordan en este trabajo se centra en **evaluar comparativamente la microbiota que se desarrolla en distintos sistemas *in vitro* y el grado de similitud con la microbiota de la fracción líquida del contenido ruminal.**

Una ventaja importante de las técnicas de simulación es que permiten estudiar la fermentación ruminal de dietas cuyos componentes son escasamente disponibles o que puedan incluir sustancias tóxicas (Ørskov, 1980). Diversos residuos y subproductos de la industria agroalimentaria se han empleados durante décadas para la alimentación de rumiantes con notable éxito. Las ventajas del empleo de estos productos residen tanto en la disminución del coste de la alimentación de los animales como en la eliminación de residuos potencialmente contaminantes del medio. No obstante, algunos pueden contener sustancias tóxicas, como pesticidas o promotores del crecimiento, por lo que, previamente a su empleo en la dieta de los animales, han de estudiarse utilizando sistemas *in vitro*. Por ello, otro de los objetivos del presente trabajo ha sido **estudiar, en cultivos no renovados de microorganismos y en fermentadores de flujo continuo simple, el efecto de incluir en la dieta del rumiante destríos de tomate y pepino procedentes de invernaderos como sustitutos de la cebada, sobre la fermentación ruminal, el crecimiento microbiano y la abundancia y diversidad de algunos grupos microbianos.**

Introduction and objectives

In the XIX century microorganisms were considered for the first time not only as pathogens but also as organisms involved in essential chemical processes that take place in different ecosystems (soils, waters, rizosphere, plants and animals). At that time the study of bacteria from different environments started. In the XX century the contributions of Beijerinck and Winogradsky to the knowledge of microbial communities of sea water and soil boosted the development of Microbial Ecology (Madsen, 2008). As in other ecosystems, fermentation processes that take place in the rumen cannot be understood without considering microorganisms living in the rumen. Ruminant fermentation mostly determines the use of feedstuffs, body performance and milk production (Dehority, 2003). The study of ruminal microorganisms was initiated 60 years ago with Robert Hungate's works. This scientist was a pioneer in the study of gut microbiota in insects and rumen cattle and he was the initiator of anaerobic culture methodologies, still used (Chung y Bryant, 1997). Since those days numerous studies about ruminal microbiota have been carried out but the complexity of this ecosystem, regarding species composition and physiology, makes its knowledge riddled with doubts. The use of molecular techniques, based on the amplification of target sequences as rDNA 16S or the gene *mcr A*, has improved notably the knowledge of rumen microbial community composition, even for uncultured species (Firkins et al., 2008). However, this issue is still very complex due to many factors that determine a high variability in ruminal microbiota.

Many of these factors, still not well known, could be related to the host animal (Ziemer et al., 2000; Wallace, 2008). Host animal specificity for gut microbiota has been described in vertebrates and invertebrates (Ley *et al.*, 2008). Some authors hold that differences in gut microbiota among individuals from the same species are even higher to those found among animals from different species (Ley *et al.*, 2008; Wallace, 2008). Certain studies studying the human digestive tract and the rumen have revealed that predominant species in an individual show temporal stability and high resistance to be displaced by microorganisms from other animal (Zoetendal *et al.*, 1998; Weimer *et al.*, 2010). An interaction between certain gut substances and microbiota has been observed as well. That interaction may be

responsible for the variable host capacity to respond to different substances, included toxic compounds which reach the digestive tract (Nicholson *et al.*, 2005). Knowledge about animal to animal variability of rumen microbiota is very scarce and derived from some works carried out in sheep and cattle (Weimer *et al.*, 2010; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010). Individual variability has important practical repercussions such as the efficiency in the digestive utilization of nutrients (Guan *et al.*, 2008; Hernandez-Sanabria *et al.*, 2010). To contribute to the knowledge of individual variability in gut microbiota one of the aims of this Ph D Thesis was **to study the animal to animal variability of ruminal bacteria populations' structure in goats and the persistence of the differences after swapping of rumen content from one animal to other.**

The high variability found in *in vivo* experiments could be avoided by using *in vitro* simulation systems, which allow a more strict control of experimental conditions than *in vivo* experiments do. Simulation techniques are also very useful to overcome other difficulties implicit in *in vivo* assays, such as the laboriousness and difficulty in animals' management, the high economical cost, ethical issues, etc. Different *in vitro* systems have been used for the nutritive evaluation of conventional and unconventional feedstuffs (Soder *et al.*, 2007; Molina-Alcaide *et al.*, 2010a), in basic studies of ruminal fermentation (Cotta y Russell, 1982; Fellner *et al.*, 1995) and to evaluate the effect of additives (Kung *et al.*, 1997; Carro y Ranilla, 2003; Busquet *et al.*, 2005). The suitability of any *in vitro* simulation system as a reliable experimental tool lies mostly in its ability to maintain microbial density and composition in similar levels to those in the rumen (Warner, 1956; Davey *et al.*, 1960; Ziemer *et al.*, 2000). Certain works with continuous (Mansfield *et al.*, 1995; Ziemer *et al.*, 2000; Cantalapiedra-Hijar, 2009; Muetzel *et al.*, 2009) and semi-continuous (Rusitec, Martínez *et al.*, 2010b) systems have already shown that bacteria densities and populations' structure are very different in rumen and fermenters. However, few works have studied temporal changes of microbiota in *in vitro* systems (Slyter y Putnam, 1967; Prevot *et al.*, 1994; Ziemer *et al.*, 2000; Muetzel *et al.*, 2009) or monitored what happens during the adaptation to diet (Cardozo *et al.*, 2004; Busquet *et al.*, 2005; Castillejos *et al.*, 2005, 2007; Martínez *et al.*, in press). Literature shows a high variability regarding to the

suitable duration of adaptation to *in vitro* conditions (Mansfield *et al.*, 1995; Carro *et al.*, 1999; Busquet *et al.*, 2005; Castillejos *et al.*, 2005; Molina-Alcaide *et al.*, 2009a, b; Martínez *et al.*, 2010a, b). To establish the length of *in vitro* microbial community stabilization is essential to know the appropriate time for sampling without biased further results. For that reason, another objective of this PhD Thesis was **to evaluate temporal evolution of bacterial, archaeal, fungal and cellulolytic populations along with changes in bacterial diversity and structure during the course of a 7 d- adaptation period in single-flow continuous-culture fermenters.**

At present, there are different kinds of *in vitro* simulation systems with different levels of complexity and, hence, suitable for diverse objectives. Degradability and digestibility of conventional and unconventional feedstuffs have been determined *in vitro* for more than 50 years. *In vitro* systems developed for gas production measurement have been traditionally used for estimating digestibility of conventional feedstuffs, but nowadays they are very useful to study rumen microorganisms activity and the effect of additives, antinutritive factors and enzymes on ruminal fermentation as well (Carro y Ranilla, 2003; Ammar *et al.*, 2004; Ungerfeld *et al.*, 2007; Giraldo *et al.*, 2008; Moya, 2011). More complex techniques such as fermenters are more suitable than previously mentioned *in vitro* systems to simulate ruminal fermentation during longer incubation times (Busquet *et al.*, 2005). However, information related to microbiota that develops in any *in vitro* system is still very scarce. Additionally, there is not information about the similarities between *in vitro* incubation medium and rumen liquid concerning microbial consortia. Improving knowledge of these issues could boost the potential of these techniques. For that reason, another objective of this work was **to evaluate the microbiota which grows in different *in vitro* systems and its similarity to that present in the liquid fraction of rumen content.**

An important advantage of simulation techniques is that they allow testing diets whose components are scarce or toxic (Ørskov, 1980). Some agroindustrial wastes and by-products have been successfully used for decades in ruminant feeding. The use of unconventional feedstuffs allows to reduce feeding cost and to eliminate potential pollutants from the environment. However, as some of them can contain

toxic compounds, such as pesticides or growth factors, it is necessary to test them in *in vitro* conditions before to be supplied to animals. In this regard, another objective of this work was **to evaluate, in batch cultures and single-flow continuous-culture fermenters, the effect of replacing barley grain with tomato and cucumber wastes, from greenhouse agriculture, on rumen fermentation, microbial growth and abundance and diversity of some ruminal microorganisms.**

Capítulo 2

Revisión bibliográfica

2.1. EL ANIMAL RUMIANTE

2.1.1. Importancia ecológica

Las plantas presentan un importante reservorio de hidratos de carbono en forma de polisacáridos estructurales. La celulosa, componente de la pared celular vegetal, es el más importante carbohidrato de la misma y constituye la mayor parte de la biomasa terrestre. Sin embargo, este reservorio de energía, no está disponible para su aprovechamiento directo por parte de los animales y humanos. Vertebrados e invertebrados carecen de las enzimas necesarias para la degradación de la fibra, presentes exclusivamente en ciertos microorganismos. A lo largo de su historia evolutiva, los animales herbívoros y ciertos microorganismos han desarrollado y perfeccionado una relación simbiótica mutualista, en la cual los microorganismos aportan su potencial degradador de numerosos compuestos, parte de los cuales son recalcitrantes para los sistemas enzimáticos del tracto digestivo animal, como celulosa, hemicelulosa y lignina. El tracto digestivo de herbívoros, rumiantes y no rumiantes, presenta determinadas regiones (rumen, colon, ciego) que albergan una importante microbiota. En función de la localización de la microbiota, los animales herbívoros pueden clasificarse en fermentadores pre-gástricos o rumiantes y fermentadores post-gástricos. La fermentación pre-gástrica posibilita una utilización más eficiente de los forrajes que la postgástrica, ya que la primera implica que el material vegetal experimenta una mayor degradación antes de pasar por el intestino delgado, donde tiene lugar la absorción de la mayoría de los nutrientes (Moir, 1965). Esta mayor degradación es debida a que el tiempo de permanencia de la fibra en el rumen es notablemente superior al que permanece en el intestino y a que la actividad celulolítica es mucho más intensa en el rumen (Michalet-Doreau *et al.*, 2002; Huhtanen *et al.*, 2006).

Los primeros rumiantes aparecieron en la Tierra hace unos 50 millones de años. A lo largo de este periodo de tiempo, aquellos primeros organismos de no más de 5 kg de peso, moradores de los bosques y omnívoros, han evolucionado y se han diversificado considerablemente y, en la actualidad, existen unas 200 especies de rumiantes, tanto domésticos como salvajes. Su amplia adaptabilidad al medio natural, consecuencia de su capacidad para aprovechar alimentos de baja calidad, ha posibilitado una radiación adaptativa mayor que la de herbívoros

fermentadores post-gástricos y la cría de estos animales incluso en los ambientes más extremos. La domesticación de los rumiantes se inició hace unos 9.000 años, en el Neolítico (van Soest, 1994), siendo la cabra el primer rumiante domesticado (Boyazoglu *et al.*, 2005). Esta especie tiene una gran resistencia a ambientes muy hostiles, debido a su capacidad para recorrer largas distancias, seleccionar los alimentos más nutritivos y utilizar eficientemente aquellos con bajo contenido en nutrientes (Morand-Fehr *et al.*, 2004).

2.1.2. Fermentación microbiana en el rumen

Los rumiantes ingieren el alimento prácticamente sin masticar, sometiéndolo posteriormente al proceso de rumia, que consiste en la regurgitación de parte del contenido ruminal hacia la boca, donde es cuidadosamente masticado e insalivado antes de ser deglutido. La rumia contribuye a disgregar y reducir el tamaño medio de las partículas del alimento, lo cual favorece la colonización y ataque de los microorganismos ruminales (van Soest, 1994). El tracto digestivo de los rumiantes presenta un estómago complejo, formado por 4 cámaras: 3 pre-estómagos y un estómago verdadero. El rumen, el mayor de estos compartimentos, es una gran cámara de fermentación en la que tienen lugar diversas reacciones químicas catalizadas por enzimas microbianas. Este compartimento está constituido, a su vez, por varias cavidades o sacos, separados mediante pilares musculares. La anatomía del rumen tiene una importancia crucial en la degradación de la fibra. Por un lado, las contracciones de las paredes del rumen posibilitan un buen mezclado de la digesta con la microbiota, lo cual, unido a la disminución del tamaño del alimento por su trituración, potencia la acción fermentativa de los microorganismos. Por otro lado, el orificio retículo-omasal permite retener el alimento en el rumen durante un largo periodo de tiempo, asegurando la acción de las enzimas microbianas sobre la fibra (Mackie *et al.*, 1997). El epitelio ruminal es de tipo plano y pseudoestratificado, con numerosas prolongaciones denominadas papilas, a través de las cuales tiene lugar la absorción de diversos productos finales de la fermentación microbiana. El tipo de alimentación del animal influye en la anatomía del rumen, de tal modo que un animal fundamentalmente ramoneador presenta mayores dimensiones tanto del rumen como de los pilares ruminales que

uno selector de frutos. Por el contrario, en rumiantes selectores de frutos las papilas ruminales y el retículo están más desarrollados que en los ramoneadores (Kay *et al.*, 1980).

Los productos finales de la fermentación microbiana, que tiene lugar en el rumen, son principalmente ácidos grasos volátiles (AGVs), ácido láctico, masa microbiana, CO₂, CH₄, y NH₃. Los AGVs y el NH₃ son absorbidos por las paredes del rumen y el resto de los productos de la fermentación y parte de la masa microbiana pasan al abomaso, donde son digeridos por las enzimas del hospedador. Los microorganismos que llegan al abomaso, fundamentalmente bacterias y protozoos, constituyen la principal fuente de proteína para el animal. De hecho, más de un 70% de los aminoácidos duodenales, dependiendo del tipo de dieta, tienen un origen microbiano (van Soest, 1994). Como resultado de las diversas fermentaciones microbianas, el pH ruminal puede descender considerablemente, impidiendo la actividad de diversas especies de microorganismos, especialmente aquellos que presentan actividad fibrolítica. Para evitar esto, el sistema se tampona eficazmente mediante las sales presentes en la saliva y el bicarbonato disuelto en el líquido ruminal (Counotte *et al.*, 1979).

2.2. EL ECOSISTEMA RUMINAL

2.2.1. Introducción

El premio Nobel de Fisiología y Medicina del año 1958, Joshua Lederberg, acuñó el término “microbioma” a principios de la década pasada para designar a la comunidad microbiana que vive dentro y fuera de un ser humano; es decir, el cuerpo humano sería un super-organismo, integrado por células propias y microorganismos comensales, mutualistas y patógenos (Lederberg y McCray, 2001). En la actualidad, el término microbioma hace referencia, en un sentido más amplio, al conjunto de genomas microbianos que habitan un determinado ambiente, por ejemplo el intestino grueso o el rumen. Este concepto no solo hace referencia a las poblaciones microbianas, sino a todo el ecosistema microbiano, es decir, el conjunto de los microorganismos, el ambiente en el que viven y las interacciones que existen entre microorganismos y hospedador. El rumiante y su

microbiota ruminal establecen un tipo de relación simbiótica mutualista en la que el animal hospedador aporta un hábitat adecuado y nutrientes que permiten el crecimiento de los microorganismos y estos, a su vez, proveen al animal de proteínas, vitaminas y ácidos grasos de cadena corta (van Soest, 1994). Por otra parte, los microorganismos ruminales establecen complejas relaciones entre sí, que permiten la degradación del alimento que llega al rumen y, en consecuencia, la utilización de los nutrientes que contiene (Mackie, 1997). Aparte de estas relaciones de cooperación, y al igual que en cualquier otro ecosistema, también en el rumen se establecen relaciones de competencia intra e inter-específica y de predación (Ley *et al.*, 2006).

La microbiota del rumen dispone de estrategias que le permiten la colonización, supervivencia y crecimiento en el ambiente ruminal: i) moléculas que posibilitan la adhesión, colonización y degradación de los sustratos, otras capaces de inhibir el crecimiento de competidores (bacteriocinas) o de sobrevivir al sistema inmunitario del animal hospedador; ii) plasticidad genética para adaptarse a los cambios que puedan producirse en este hábitat y iii) altas tasas de multiplicación que permiten el mantenimiento de poblaciones microbianas estables (Ley *et al.*, 2006).

El conocimiento de los microorganismos ruminales resulta difícil ya que el rumen, como sistema abierto que es, presenta una compleja microbiota en la que conviven especies microbianas que residen de forma estable con otras que se incorporan del medio externo o de la cavidad bucal del animal, y que solo permanecen temporalmente en el rumen. La mayor parte de los microorganismos que componen la microbiota ruminal son bacterias, esencialmente anaerobias estrictas pero también anaerobias facultativas y aerobias. Otros componentes de la microbiota ruminal son protozoos ciliados y flagelados, arqueas, hongos y virus. Las estimaciones del número de especies microbianas ruminales proporcionan resultados muy heterogéneos y que dependen, en gran medida, de la forma en que se cuantifiquen (Edwards *et al.*, 2004; Sundset *et al.*, 2007). Se estima que en el rumen podría haber más de 1.000 especies distintas de bacterias, protozoos y hongos (Deng *et al.*, 2008), que filogenéticamente pertenecen a los 3 dominios de la vida (Woese *et al.*, 1990), esto es *Bacteria*, *Archaea* y *Eucarya*.

La colonización del rumen del animal neonato por los microorganismos empieza en el momento del nacimiento, cuando éste pasa por el canal del parto. La colonización continúa posteriormente por el contacto directo del animal joven con los adultos o los pastos, comederos, abrevaderos, etc. contaminados con saliva y heces de los adultos (Dehority, 2003). La composición y evolución de la microbiota ruminal de un animal están determinadas por factores diversos tales como la edad, localización geográfica, interacción hospedador-microorganismos, dieta, frecuencia con que el animal se alimenta, etc. (Dehority y Orpin, 1997).

Bacterias y arqueas constituyen el 50 - 60% de la masa microbiana del rumen (Stewart *et al.*, 1997) y de ellas, un 50 - 70% se encuentran asociadas a las partículas sólidas del contenido ruminal (Cheng *et al.*, 1977; Merry y McAllan, 1983). El número de las mismas es de 10^{10} - 10^{11} células/ml de contenido ruminal (Hungate, 1966). Mediante técnicas de cultivo se estimó la existencia de unas 200 especies de organismos procariotas en el rumen, 20 - 30 de las cuales serían predominantes (Bryant, 1959; Stewart *et al.*, 1997). Estas estimaciones, no obstante, están muy lejos de representar toda la diversidad bacteriana (bacterias y arqueas) ya que las especies cultivables representarían tan solo un 10 - 15% del total (Hespell *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 2004). Estimaciones más recientes, basadas en el análisis del ADN ribosómico 16S, indican la existencia en el rumen de 300 a 400 especies bacterianas (Edwards *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2006). Otros autores, basándose en cálculos matemáticos, consideran que en el rumen existen hasta 16.000 taxones diferentes (Curtis *et al.*, 2002; Edwards *et al.*, 2004), considerando diferencias inferiores al 95% en la secuencia del ADN 16S.

2.2.2. Bacterias

Los microorganismos pertenecientes al dominio *Bacteria* (antes denominado *Eubacteria*) están implicados en múltiples actividades metabólicas (degradación de carbohidratos simples y complejos, lípidos, proteínas, etc.). En el rumen, los organismos de este dominio pertenecen, fundamentalmente, a los phyla Gram Positivas con alto contenido en guanina - citosina (G + C); Gram Positivas con bajo contenido en G + C (ahora denominadas phylum *Firmicutes*); *Proteobacteria*;

Spirochaetes y el Grupo *Cytophaga – Flexibacter – Bacteroides* (CFB) (renombrado como phylum *Bacteroidetes*). Edwards *et al.* (2004) revisaron la información referente a librerías del gen ribosómico 16S y concluyeron que los grupos más ampliamente representados en el rumen eran los de *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (54 y 40% del total de la población bacteriana ruminal, respectivamente). Sin embargo, las proporciones podrían variar ampliamente (2 – 79%; Firkins y Zu, 2006) en función de diversos factores tales como el manejo de la muestra y su procesado posterior (Whitford *et al.*, 1998; Ramšak *et al.*, 2000; Edwards *et al.*, 2004), diferencias geográficas (Ramšak *et al.*, 2000), la fracción o compartimento ruminal considerado (Tajima *et al.*, 1999) o la dieta suministrada al animal (Tajima *et al.*, 2000; Larue *et al.*, 2005).

2.2.3. Arqueas

Las arqueas, a pesar de su parecido morfológico con las bacterias, son un grupo de microorganismos procariotas completamente distintos. Englobados primero junto a las eubacterias en el grupo mórneras, estos microorganismos se incluyeron posteriormente (Woese *et al.*, 1990) en el dominio *Archaeobacteria* (*Archaea* en la actualidad). Estudios de la secuencia del ADN ribosómico 16S llevaron a Woese y su grupo a considerar que eubacterias y arqueas no eran tan parecidas entre sí. Otras peculiaridades de la pared y membrana celulares, diferencias en la estructura de la enzima ARN polimerasa y del ARNt, así como la presencia de un ARN 7S, no ribosómico (Fox *et al.*, 1980; Luehrsen *et al.*, 1985), hacen a estos microorganismos distintos de las eubacterias. Diversos autores (Lin *et al.*, 1997; Sharp *et al.*, 1998; Ziemer *et al.*, 2000) han cuantificado el porcentaje de ARNr 16S en rumen, perteneciente a estos microorganismos, que oscila entre el 0.3 – 3.3% del total de ARNr microbiano ruminal (16S y 18S). Las bacterias responsables de la producción de metano pertenecen a este grupo de microorganismos y, por ahora, son las únicas arqueas conocidas del rumen. No obstante, ciertos autores contemplan la posibilidad de que existan otras arqueas no cultivadas con una función diferente a las metanogénicas (Tajima *et al.*, 2001b). Las arqueas metanogénicas se encuentran en títulos de entre 10^7 y 10^9 células/ml dependiendo del tipo de dieta que recibe el animal y, especialmente, de la proporción de fibra

que dicha dieta contiene (Stewart *et al.*, 1997), aunque en cultivo puro sólo se han aislado unas pocas especies (Mackie *et al.*, 2002; Boadi *et al.*, 2004). Estos microorganismos son altamente sensibles a la presencia de O₂, por lo que su cultivo requiere el mantenimiento de una anaerobiosis estricta (Stewart *et al.*, 1997). Las arqueas metanogénicas se encuentran libres en el líquido ruminal, adheridas a partículas sólidas de alimento, adosadas al epitelio del rumen, adheridas a protozoos o en el interior de ellos (Janssen y Kirs, 2008). Se estima que las arqueas metanogénicas asociadas a protozoos ciliados podrían suponer hasta un 20% del total de las mismas (Mackie *et al.*, 2002). Su diversa localización en el rumen podría determinar diferencias en la velocidad de crecimiento puesto que la tasa de dilución en cada compartimento es distinta (Janssen y Kirs, 2008).

2.2.4. Protozoos

Los protozoos se establecen en el rumen unas 2 semanas tras el nacimiento y mediante un proceso secuencial que dura entre 15 y 50 días (Fonty *et al.*, 1988). La adquisición de los protozoos por el animal joven se realiza por contacto con otros animales, en especial con la saliva o el contenido ruminal regurgitado durante la rumia, y también a través del agua de bebida (Dehority, 2003), debido a la imposibilidad de estos microorganismos de sobrevivir en el medio exterior, puesto que no presentan fase de resistencia en su ciclo de vida. Se sabe, además, que los protozoos ciliados requieren de una previa colonización bacteriana para llegar a establecerse en el rumen (Fonty *et al.*, 1988). La concentración de estos microorganismos en el rumen de un animal adulto sano es de 10⁵-10⁶ células/ml (Hungate, 1966), pudiendo representar hasta el 50% de la masa microbiana. Su identificación y clasificación ha resultado tradicionalmente complicada puesto que no podían cultivarse axénicamente. Las clasificaciones tradicionales de protozoos se han realizado en base a su morfología e indican que existen dos grandes grupos, uno de flagelados y otro de ciliados. Se conoce poco acerca del primero pero se sabe que los protozoos ciliados son los más numerosos e importantes y que se subdividen en 2 grupos: holotricos y entodiniomorfos (Williams y Coleman, 1997). El uso de técnicas moleculares ha permitido profundizar en el conocimiento de las relaciones filogenéticas de los distintos tipos de protozoos, su abundancia y

distribución en el rumen (Wright *et al.*, 1997; Wright, 1999; Karnati *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2004).

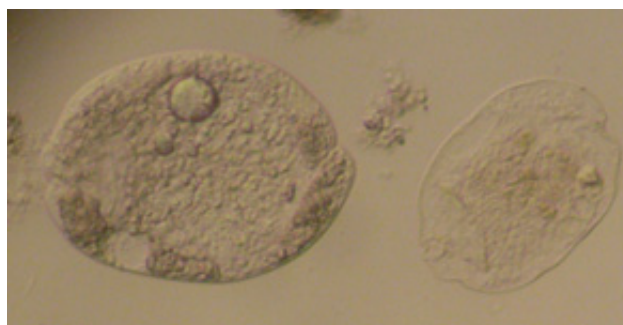


Imagen 2.1. Protozoos ciliados vistos al microscopio óptico.

Puesto que los protozoos son incapaces de llevar a cabo la síntesis de aminoácidos a partir de amonio (Jouany y Ushida, 1999), su crecimiento depende fundamentalmente de la proteína disponible en el rumen y de las bacterias a las que predan (Mackie *et al.*, 2002). No obstante, son capaces de utilizar carbohidratos solubles y pectinas y de degradar carbohidratos complejos, estructurales y no estructurales. Además, algunos protozoos llevan a cabo la predación de otros protozoos (Mackie *et al.*, 2002). Su papel en el rumen no está claro debido a las limitaciones que ha implicado, hasta ahora, su cultivo *in vitro*. Algunos autores no han encontrado grandes modificaciones del metabolismo ruminal en ausencia de protozoos (Ushida *et al.*, 1991), mientras que otros han observado importantes cambios como, por ejemplo, una disminución significativa de la digestibilidad de la materia orgánica (Eugène *et al.*, 2004a, b), que puede explicarse en parte por la actividad celulolítica y hemicelulolítica de estos microorganismos (Williams *et al.*, 1984; Jouany y Ushida, 1990). También se ha observado un aumento en la concentración de amonio y del flujo de proteína bacteriana hacia el duodeno en animales libres de protozoos, como consecuencia de la reducción de la degradación de las proteínas bacterianas, tras ser fagocitadas por los protozoos, y la disminución del reciclado del nitrógeno total (Koenig *et al.*, 2000). Dado que algunos protozoos, como las especies más pequeñas del género *Entodinium sp.*, fagocitan y metabolizan el almidón, reducen la rápida fermentación bacteriana del mismo y el descenso brusco del pH, actuando como tamponadores (Wakita y Hoshino, 1989). Por otra parte, se ha estimado que la contribución de

estos microorganismos al flujo de ácidos grasos insaturados al duodeno es bastante importante (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2006, 2007). Los protozoos presentan una elevada cantidad de ácidos grasos insaturados, incluyendo CLA y ácido vacénico, que provienen principalmente de la predación de bacterias (Lourenço *et al.*, 2010). Otro papel importante de los protozoos en el rumen reside en la capacidad de ciertas especies para utilizar el oxígeno. Así, los holotricos podrían considerarse organismos aerotolerantes ya que pueden sobrevivir durante periodos cortos de tiempo con bajas tensiones de oxígeno, gracias a la presencia de distintos sistemas enzimáticos que les permiten metabolizarlo (Williams, 1986).

2.2.5. Hongos

En el rumen y en otras partes del tracto gastrointestinal de animales herbívoros, rumiantes y no rumiantes, existen hongos anaerobios estrictos cuya pared celular es rica en quitina. Al contrario que los hongos aerobios, no presentan mitocondrias sino unos orgánulos, denominados “hidrogenosomas”, que generan ATP e H₂, y que, posiblemente, albergan un genoma rudimentario, similar al mitocondrial (Boxma *et al.*, 2005). Es posible que el hidrogenosoma haya evolucionado a partir de las mitocondrias (van der Giezen *et al.*, 1997).

Se ha observado que los hongos se establecen en el rumen entre los 8 y 10 días tras el nacimiento del animal rumiante (Fonty *et al.*, 1987). Es difícil establecer con certeza la biomasa fúngica que existe en el rumen en un momento determinado, debido a que en el ciclo de vida de estos microorganismos existe una fase vegetativa o rizoide y una fase reproductiva móvil, denominada zoospora (Orpin, 1994). Sin embargo, mediante el marcaje de la quitina de la pared celular fúngica, se estimó que los hongos pueden suponer hasta el 8% del total de la biomasa microbiana del rumen (Orpin, 1981). En ovejas se ha encontrado que las zoosporas representan entre 10³ y 10⁵/ml de contenido ruminal (Orpin y Joblin, 1997).

El ciclo de vida de los hongos puede tener una duración de entre 24 y 72 horas (Orpin y Joblin, 1997). La fase vegetativa se encuentra adherida a las partículas de fibra, preferentemente a aquellas con mayor grado de lignificación (Akin y Rigsby, 1987), mientras que las zoosporas se encuentran libres en la fase líquida de la

digesta. Las zoosporas son atraídas quimiotácticamente por los carbohidratos solubles liberados, especialmente en zonas rotas o en los estomas de la planta (Orpin y Bountiff, 1978). En estas zonas, las esporas se adhieren, enquistan y germinan, dando lugar a un rizoide que penetra en la planta y que representa la fase vegetativa del hongo. A partir del micelio, que se desarrolla en el material vegetal, se generan nuevos esporangios en los que se originarán nuevas zoosporas, cerrándose así el ciclo (**Imagen 2.2**).

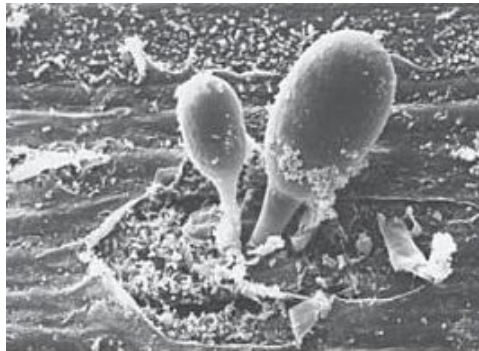


Imagen 2.2. Detalle de un esporangio fúngico que ha germinado a partir del micelio desarrollado en una partícula de fibra (Cheeke y Dierenfeld, 2010).

2.2.6. Virus

La población de virus que lisan bacterias (bacteriófagos) en el rumen es muy elevada, existiendo estimaciones que la sitúan por encima de 10^7 e incluso de 10^{10} partículas/ml (Paynter *et al.*, 1969; Klieve y Bauchop, 1988; Klieve y Swain, 1993), con variaciones que pueden deberse a la naturaleza de la dieta que recibe el animal o a la abundancia de bacterias en el rumen (Swain *et al.*, 1996).

Aunque desde los años 60 se han llevado a cabo trabajos que estudian los bacteriófagos del rumen, la información referente a estos microorganismos no es muy extensa, en particular la referente al papel que desempeñan en el ecosistema ruminal. Podrían tener un efecto beneficioso en el reciclado de la proteína bacteriana o el control de la densidad poblacional de determinadas especies bacterianas. También se les ha asignado un potencial efecto negativo sobre la eficiencia de degradación del alimento debido a la capacidad de los bacteriófagos para lisar las bacterias que se encargan directamente de degradar el alimento (Swain *et al.*, 1996). Además, la lisis de bacterias puede producir una pérdida de

proteína microbiana por la fermentación secundaria de los componentes de las bacterias lisadas (Orpin y Munn, 1974). Los bacteriófagos del rumen presentan también un gran potencial como vectores génicos en biotecnología bacteriana, para la transformación de bacterias ruminales con fines diversos, como aumentar la productividad ruminal (Klieve y Bauchop, 1988) o eliminar determinadas poblaciones de bacterias como *Streptococcus bovis* o arqueas metanogénicas (Klieve y Hegarty, 1999; Herrera *et al.*, 2009).

2.2.7. Degradación de nutrientes en el rumen

Las clasificaciones filogenéticas de los microorganismos ruminales, mencionadas previamente, no ofrecen información acerca de sus funciones metabólicas. Los microorganismos siguen clasificándose en función de factores como el sustrato que degradan, diferenciándose grupos de microorganismos proteolíticos, lipolíticos, amilolíticos, celulolíticos, pectinolíticos, utilizadores de hidrógeno, etc. (Yokoyama y Johnson, 1988). Algunas actividades metabólicas son llevadas a cabo por grupos o especies microbianas muy diversos, mientras que otras son exclusividad de solo algunas especies, como es el caso de la degradación de la celulosa (Wallace, 2008). A continuación se describen las actividades metabólicas de microorganismos que han sido objeto de estudio en este trabajo: fibrolíticos y metanogénicos.

2.2.7.1. Degradación de los polímeros de la pared celular

Los polímeros estructurales de la pared celular incluyen polisacáridos como la celulosa, la hemicelulosa, las pectinas y los β -glucanos, y polifenoles de gran complejidad como las ligninas. Las pectinas y β -glucanos son parcialmente solubles en agua y, al no estar asociados a la lignina, pueden degradarse con una relativa rapidez. La celulosa y las hemicelulosas pueden formar enlaces covalentes con la lignina, lo que reduce su degradabilidad (Buchanan *et al.*, 2000). Las bacterias ruminales pueden degradar celulosa y hemicelulosas, pero parecen incapaces de degradar la lignina. Los hongos del rumen, por el contrario, tienen la capacidad de degradar las ligninas, mediante solubilización, aunque son incapaces de metabolizarlas (**Imagen 2.3**) (Akin y Borneman, 1990). Además, las esterasas y

proteasas de que disponen los hongos posibilitan una penetración más eficaz del material lignocelulósico. Este hecho, unido a su capacidad de degradar lignina, posibilita el acceso de otros microorganismos al contenido celular (Fonty y Joblin, 1990).

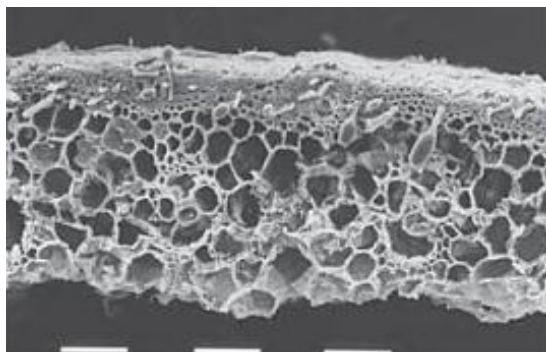


Imagen 2.3. Colonización fúngica de paja de trigo. La solubilización de la lignina llevada a cabo por estos organismos proporciona puntos de entrada a otros organismos para la degradación de la celulosa y las hemicelulosas (Cheeke y Dierenfeld, 2010).

La colonización de la fibra que llega al rumen se inicia pronto. Así, tanto bacterias como protozoos inician la adhesión a las partículas de fibra en los primeros 5 minutos de su entrada al rumen (McAllister *et al.*, 1994). Los hongos tardan más en colonizar el material vegetal debido a las características peculiares del proceso: como respuesta a la liberación de carbohidratos solubles, procedentes de la degradación de la fibra, el micelio fúngico produce y libera esporas, que, mediante movimientos quimiotácticos, se dirigen hacia las partículas de fibra (Orpin y Joblin, 1997).

Las bacterias, conocidas y cultivadas, con mayor actividad celulolítica son *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus* (Chesson y Forsberg, 1997). *Fibrobacter succinogenes* presenta una mayor capacidad de degradación de la fibra que las otras especies de ruminococos (Malburg y Forsberg, 1993; Malburg *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 2008). Se ha observado que estas 3 especies bacterianas pueden colonizar extensamente las partículas en tan solo 10 minutos, iniciándose la degradación de la fibra al comenzar la fase exponencial de crecimiento de estos microorganismos (Koike *et al.*, 2003a). El conteo directo de células totales y viables muestra que las

celulolíticas no son las bacterias más abundantes en el rumen, incluso en animales alimentados con forrajes, sino que las más abundantes son las bacterias utilizadoras de almidón y de glucosa (Leedle *et al.*, 1982). Mediante hibridación o PCR en tiempo real, se ha observado que esas 3 especies de bacterias celulolíticas representan una baja proporción del ARNr bacteriano total presente en el rumen (9%, Michalet-Doreau *et al.*, 2001; 2%, Stevenson y Weimer, 2007). Weimer *et al.* (2008) encontraron valores inferiores al 1% para cada una de estas especies, siendo *Fibrobacter succinogenes* la más abundante (0.03% - 0.06% para *Ruminococcus albus*, 0.4% - 1% tanto para *Ruminococcus flavefaciens* como *Fibrobacter succinogenes*). Otros autores también han encontrado mayores niveles de *Fibrobacter succinogenes* que de las otras dos especies de ruminococos (Michalet-Doreau *et al.*, 2001; Koike y Kobayashi, 2001; Tajima *et al.*, 2001a; Koike *et al.*, 2003a; Shinkai y Kobayashi, 2007; Koike *et al.*, 2007). En las librerías de clones se ha observado una baja representatividad de todas estas especies, en especial de *Fibrobacter succinogenes*, prácticamente inexistente probablemente debido a una baja eficiencia en la amplificación de esta bacteria, cuyo umbral de detección por PCR en tiempo real es considerablemente más alto que el de otras especies (Tajima *et al.*, 2001a; Firkins y Zu, 2006).

Las bacterias celulolíticas presentan una alta especialización por la celulosa y sus derivados inmediatos (celodextrinas y celobiosa) pero no degradan oligosacáridos, los cuales son degradados por otros organismos ruminales (Hungate, 1966; Weimer, 1996). *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus albus* son también capaces de utilizar la glucosa, pero no así *Ruminococcus flavefaciens* (Stewart *et al.*, 1997). Todas estas bacterias presentan, además, una cierta actividad hemicelulolítica (Dehority, 1973). Los AGVs y el amonio son importantes factores para su crecimiento (Stewart *et al.*, 1997). A diferencia de los organismos celulolíticos aerobios, productores de enzimas celulolíticas extracelulares individuales, las bacterias celulolíticas anaerobias del rumen poseen un complejo sistema multienzimático. El sistema se denomina “celulosoma”, se encuentra anclado a la cubierta celular por un lado y en el otro lado presenta un dominio de unión al sustrato. Cuando la bacteria se ancla a la celulosa, a través del celulosoma, se desencadena la acción de sus enzimas (Schwarz, 2001). Existen otros

mecanismos de adhesión de las bacterias a las partículas de celulosa como las fimbrias, componentes del glicocálix de la pared celular, proteínas adhesinas, etc. (Miron *et al.*, 2001). La adhesión de estas bacterias al sustrato incrementa el tiempo de retención de las mismas en el rumen (Weimer, 1996).

Otras bacterias con cierta actividad celulolítica son *Eubacterium cellulosolvens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella briannti* y varias especies de clostridios (Mackie *et al.*, 2002; Krause *et al.*, 2003). Ciertos protozoos entodiniomorfos, concretamente las especies de mayor tamaño, son capaces de utilizar la celulosa aunque en menor medida que las bacterias (Coleman, 1985, 1986). Los hongos también poseen la capacidad de degradar el material lignocelulósico de la dieta (Akin y Borneman, 1990) aunque presentan tasas de degradación más bajas que las de bacterias y un crecimiento más lento, que condiciona un mayor lavado de los mismos y una menor persistencia en el rumen (Krause *et al.*, 2003). A pesar de ello existen evidencias de su importante papel en la degradación de la fibra: alta presencia en animales alimentados con dietas ricas en fibra (Kamra *et al.*, 2003), disminución del nivel de degradación de la fibra en el rumen y reducción de la ingesta (Gordon y Phillips, 1993) cuando se suprimen estos microorganismos. Por otra parte, aunque los hongos no sean capaces de metabolizar las ligninas sí que pueden solubilizar sus constituyentes fenólicos (Akin y Borneman, 1990), facilitando el subsiguiente ataque y degradación del material fibroso por las bacterias celulolíticas.

Entre los organismos hemicelulolíticos destacan *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium ruminantium* y *Butyrivibrio fibrisolvens*, así como ciertos hongos, todos ellos fundamentalmente degradadores de xilanos. *Laschnospira multiparus* y *Streptococcus bovis*, y *Fibrobacter succinogenes*, en menor medida, son capaces de degradar pectinas (Mackie *et al.*, 2002). Algunas especies de protozoos también pueden degradar las pectinas (Orpin, 1984).

2.2.7.2. Microorganismos productores de metano

Las arqueas metanogénicas utilizan el H₂, generado por las fermentaciones llevadas a cabo por otros microorganismos (bacterias, protozoos y hongos), para reducir el CO₂ a metano y obtener energía. Esta es la vía principal de generación de metano; no obstante, ciertas especies de arqueas son capaces de producirlo también a partir de formiato, acetato, metilamina y metanol, estos últimos procedentes de la desmetilación de polímeros vegetales (Wolin *et al.*, 1997). La formación de metano en el rumen contribuye, de manera muy importante, a reducir la eficiencia de utilización de la energía por el rumiante puesto que implica una pérdida del 2 - 12% de la energía que el animal ingiere (Johnson y Johnson, 1995). No obstante, los microorganismos metanogénicos tienen un papel central en la fermentación ruminal, actuando como sumideros del H₂ que dicha fermentación genera y permitiendo el incremento de la tasa de producción de AGVs (Janssen y Kirs, 2008). Se ha postulado que en ausencia de arqueas la degradación de la materia orgánica sería menos eficiente (McAllister *et al.*, 1996).

Las arqueas metanogénicas dependen exclusivamente de la ruta metabólica de producción de metano para obtener energía (Wolin *et al.*, 1997). Las asociadas a protozoos ciliados tienen un suministro continuo de H₂, debido a la actividad de los hidrogenosomas protozoarios (Stumm *et al.*, 1982). Esta relación simbiótica podría representar el 37% del metano total producido por el animal (Finlay *et al.*, 1994). Así, tras eliminar los protozoos del rumen se ha observado que se reduce la producción de metano entre un 20 y un 50 %, dependiendo de la dieta (Martin *et al.*, 2010).

2.2.8. Compartimentación en el rumen

Diversos estudios, realizados entre los años 60 y 80, pusieron de manifiesto que la microbiota ruminal aparece en el animal joven en una secuencia bien definida (Fonty *et al.*, 1987). Los microorganismos ruminales ocupan progresivamente el rumen y van distribuyéndose de una forma heterogénea. Los distintos compartimentos ruminales (fases líquida y sólida y la pared ruminal) alojan diferentes consorcios microbianos, con un papel determinado en la degradación

del alimento (Kong *et al.*, 2010). Las diferentes estrategias metabólicas para la utilización de los componentes de la dieta hacen posible el mantenimiento de la diversidad microbiana ruminal (Czerkawski, 1986a).

La idea del rumen como un sistema complejo, con diferentes poblaciones microbianas asociadas a fases distintas, se gestó a medida que se profundizaba en el conocimiento de la degradación de sustratos en el rumen, mediante el empleo de diferentes marcadores, solubles o asociados a las partículas de la digesta. Así, Cheng y Costerton, en 1980, subdividieron a la comunidad microbiana en 3 tipos: microorganismos asociados a la pared ruminal, libres en el líquido ruminal y adheridos a las partículas de la digesta. Posteriormente, Czerkawski (1986b) consideró dos grupos diferentes de microorganismos asociados a la fase sólida de la digesta: los asociados firmemente y los asociados de una forma más laxa.

A pesar de contener una menor biomasa microbiana que otros compartimentos, la fracción líquida del contenido ruminal ha sido el compartimento más estudiado, debido a su mayor accesibilidad. Aunque este compartimento alberga tan solo un 10% de la microbiota ruminal, tiene una gran importancia por tratarse de un “compartimento de paso” y de transporte, tanto de solutos como de microorganismos. En el compartimento líquido hay microorganismos propios y otros en tránsito, procedentes de la pared ruminal o de la fracción sólida de la digesta. Las poblaciones autóctonas de la fracción líquida del contenido ruminal están muy influenciadas tanto por el flujo de la digesta hacia el abomaso como por la concentración de solutos en ella, por lo que presentan elevadas tasas de multiplicación y renovación y una alta capacidad de adaptación a bajas concentraciones de sustratos. Las especies que se encuentran en tránsito en la fase líquida son metabólicamente inactivas. La fracción líquida es, además, la que más puede asemejarse a un sistema de cultivo continuo (Cheng y McAllister, 1997).

La fase sólida del contenido ruminal contiene la mayor parte (70 - 80%) de los microorganismos ruminales (Forsberg y Lam, 1977; Craig *et al.*, 1987; Minato *et al.*, 1993), fundamentalmente especies fibrolíticas. Los microorganismos de esta fase se asocian, con distinto grado de firmeza, a las partículas del alimento que llega al rumen, por lo que se considera que existen 2 compartimentos: uno que contiene a las especies microbianas laxamente unidas a las partículas sólidas y otro

que engloba a un conjunto de microorganismos firmemente adheridos a las partículas. Los microorganismos firmemente adheridos a partículas son los que presentan mayores densidades poblacionales; asimismo, este consorcio microbiano es el que presenta mayor diversidad en el rumen (Larue *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2010) e incluye a las principales especies degradadoras del alimento, que pueden encontrarse adheridas a las partículas o en cavidades de las mismas (McAllister *et al.*, 1994). Puesto que los microorganismos están firmemente unidos a los sustratos, son difíciles de desligar (Whitehouse *et al.*, 1994; Martín-Orúe *et al.*, 1998) y solo abandonan el rumen cuando lo hacen las partículas de alimento. Las especies laxamente adheridas a partículas pueden desligarse de las mismas con relativa facilidad por las contracciones ruminales, el flujo de la fase líquida del contenido ruminal e, incluso, por la rumia (Czerkawski, 1986b). El compartimento ruminal que alberga a las especies laxamente adheridas presenta una alta tasa de transferencia de nutrientes y elevada actividad metabólica (Cheng y McAllister, 1997).

Otro compartimento corresponde al epitelio ruminal, el cual, al estar muy irrigado y oxigenado, presenta una microbiota anaerobia facultativa (Cheng y McAllister, 1997). Muchos de estos microorganismos tienen actividad ureasa, que permite el reciclaje de la urea plasmática (Cheng y Wallace, 1979) y, una alta actividad proteolítica. La eliminación del oxígeno en el rumen, llevada a cabo por protozoos aerotolerantes y bacterias anaerobias facultativas, es vital para mantener las condiciones anaeróbicas que permiten el crecimiento y la actividad del resto de los microorganismos (Williams y Coleman, 1997).

Las bacterias de los compartimentos líquido y sólido han sido los microorganismos más estudiados del ecosistema ruminal. La composición química de la fracción bacteriana asociada a sólido (BAS) y de la fracción bacteriana asociada a líquido (BAL) es diferente (Merry y McAllan, 1983; Craig *et al.*, 1984), así como sus funciones metabólicas (Latham, 1980; Williams y Strachan, 1984) y también la composición en especies (Minato *et al.*, 1966; Larue *et al.*, 2005). Con respecto a la composición bacteriana, se sabe que la fracción BAS presenta una abundancia de especies de *Firmicutes* ligeramente mayor y menor cantidad de *Bacteroidetes* que la fracción BAL (Flint *et al.*, 2008).

El grado de adhesión de las bacterias a las partículas de alimento puede variar en respuesta a diversos factores nutricionales como el tipo de dieta, el tipo de forraje o su proporción en la dieta, la presencia de aditivos, el grosor del alimento, etc. repercutiendo, todo ello, en la proporción de BAS y BAL que existe en un momento determinado en el rumen (Devendra y Lewis, 1974; Cheng *et al.* 1977). Estos mismos factores pueden alterar la composición química y microbiana de ambas fracciones (Molina-Alcaide *et al.*, 1996, 2009a; Yang *et al.*, 2001; Larue *et al.*, 2005). Sin embargo, el efecto de la dieta sobre la diversidad de los consorcios BAS y BAL parece contradictorio. Larue *et al.* (2005) encontraron diferencias en la composición de especies de ambas fracciones bacterianas debidas a la dieta (solo heno o una mezcla de heno y alfalfa) que consumían los animales. Martínez *et al.* (2010b), en un experimento comparativo *in vivo* – *in vitro* con ovejas y Rusitec, observaron que la diversidad y estructura bacteriana de la fracción BAS solo se afectaba por el tipo de forraje y no por la relación forraje:concentrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, mientras que la fracción BAL no parecía verse afectada por ninguno de esos factores *in vivo* y sí variaba *in vitro* debido, en primera instancia, a la relación forraje:concentrado. En esta línea otros autores también han encontrado diferencias en el dinamismo de las poblaciones de las fracciones BAS y BAL aunque consideran que la primera, puesto que es un consorcio bacteriano más estable que el de la fracción BAL, presenta una población núcleo muy resistente a cambios en el ambiente ruminal y, por el contrario, la estructura poblacional de las BAL es mucho más variable y dinámica (Wallace, 2008; Welkie *et al.*, 2010).

2.2.9. Factores que determinan el asentamiento y la evolución de la microbiota ruminal

El ecosistema ruminal es un hábitat estable y dinámico, en el que las condiciones ambientales (temperatura, presión osmótica) son generalmente constantes pero la microbiota es variable en función de numerosos factores (Kamra, 2005): dieta, aditivos, el propio animal hospedador (su edad, estado de salud, localización geográfica y ritmos circadianos).

2.2.9.1. Variabilidad entre animales: efecto del hospedador

Se considera que la comunidad microbiana del tracto digestivo de animales vertebrados y de ciertos invertebrados es muy dependiente del hospedador que la alberga (Ley *et al.*, 2008). También existe una alta especificidad de la microbiota del rumen por el animal pero se han realizados pocos estudios sobre este tema. Existen trabajos que han estudiado las diferencias en la microbiota ruminal entre distintas especies. Así, se han observado perfiles bacterianos diferentes entre distintas especies de caprino (Shi *et al.*, 2008), mediante DGGE, y se han encontrado diferencias en la predominancia de distintos grupos de arqueas metanogénicas en vacuno, ovino y caprino (Lin *et al.*, 1997).

También se han detectado diferencias entre animales de la misma especie e incluso entre los pertenecientes a un mismo rebaño en cuanto a las poblaciones de fagos (Swain *et al.*, 1996), protozoos ciliados (Regensbogenova *et al.*, 2004), arqueas metanogénicas (Galbraith *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2010) y bacterias totales (Ramos *et al.*, 2009; Belenguer *et al.*, 2010) en ovino; y en las bacterias ruminales (Weimer *et al.*, 1999) y fecales en vacuno (Durso *et al.*, 2010). En ocasiones, el efecto del hospedador sobre la microbiota ruminal se ha asociado a la localización geográfica del animal (Ramšak, *et al.*, 2000), habiéndose encontrado una mayor cantidad de especies del género *Bacteroides sp.* en vacas de Japón que en las de Eslovenia, a pesar de que la dieta que recibían los animales en ambos países era muy similar. Otros autores, sin embargo, no tienen claro si el hospedador o la localización geográfica pueden ejercer un efecto sobre la estructura de ciertos microorganismos, como las arqueas metanogénicas (Wright *et al.*, 2007; Sundset *et al.*, 2009).

Otro aspecto interesante es la persistencia o estabilidad en el tiempo de la especificidad de la microbiota por el hospedador. Ciertos estudios en humanos han mostrado que la microbiota gastrointestinal, además de ser hospedador - dependiente, presenta una cierta estabilidad temporal, es decir, las especies predominantes en un individuo siempre suelen ser las mismas (Zoetendal *et al.*, 1998). La perdurabilidad temporal de las diferencias en la estructura de las poblaciones de bacterias totales y arqueas metanogénicas, debidas al tipo de dieta

administrada tras el destete, solo se ha puesto de manifiesto en un trabajo realizado en ovino (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2010).

El origen de la interrelación hospedador-microbiota puede residir en diversos factores de índole genética e inmunológica que aún no están suficientemente claros (Hooper y Gordon, 2001; Hooper *et al.*, 2001; Zoetendal *et al.*, 2001). En monogástricos se ha visto que los microorganismos poseen distintas estrategias para colonizar el tubo digestivo y enfrentarse al sistema inmunitario del hospedador, primera barrera para el asentamiento de la comunidad microbiana. Algunas de esas estrategias podrían deberse a la interacción entre los microorganismos y moléculas del tracto digestivo del hospedador. A su vez, la microbiota del tracto digestivo ejerce una acción moduladora sobre el sistema inmunitario del hospedador (Artis, 2008). Las interacciones microbiota – hospedador están mediadas por rutas complejas de señalización celular (Round y Mazmanian, 2009). La información relativa a las bases moleculares del asentamiento de la microbiota en el rumen es prácticamente inexistente. Por otro lado, dado que la microbiota ruminal se adquiere durante el parto, y más adelante, durante la lactancia y a través del contacto de la cría con su madre y otros adultos, el efecto de la madre puede ser muy importante en la adquisición de la especificidad individual de la microbiota (Skillman *et al.*, 2004) pero existe poca información al respecto.

Mejorar el conocimiento del impacto del hospedador sobre la microbiota ruminal es de extraordinaria importancia dado que las diferencias en la estructura de las poblaciones bacterianas determinan diferencias en la eficacia de utilización del alimento (Guan *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009, 2010; Hernandez-Sanabria *et al.*, 2010) y, en consecuencia, en la productividad animal. Hasta el momento, no se ha llevado a cabo ningún estudio de la variabilidad de la microbiota ruminal en caprino.

2.2.9.2. Variaciones circadianas en la microbiota ruminal

Se han observado cambios diurnos en la actividad y densidad de las bacterias ruminales, particularmente en relación al tiempo transcurrido tras el suministro del alimento al animal. La entrada de alimento en el rumen marca una serie de cambios secuenciales en la densidad de las poblaciones bacterianas. En animales alimentados una vez al día, las poblaciones de bacterias ruminales descienden, como consecuencia de una dilución del contenido ruminal debida a la entrada de alimento, agua y saliva, así como de la rápida adhesión de las bacterias a las nuevas partículas de alimento que entran al rumen (Fields *et al.*, 2000). De hecho, en experimentos *in sacco* ciertos autores han encontrado máximos en el número de bacterias adheridas a sólidos a las 24 horas de incubación (Koike *et al.*, 2003a, 2007). Algunos autores también han atribuido, al descenso del pH, la disminución en las poblaciones de celulolíticos unas pocas horas tras la alimentación (3 horas, Weimer *et al.*, 1999). Estudios, llevados a cabo mediante técnicas de cultivo, en animales alimentados una vez al día, mostraron que las poblaciones bacterianas del contenido ruminal filtrado alcanzaban valores mínimos poco tiempo después de la ingestión de alimento (1 hora, Bryant y Robinson, 1968; 1 – 4 horas, Warner, 1966c; 2 - 4 horas, Leedle *et al.*, 1982); y que, posteriormente, experimentaban una recuperación progresiva de los niveles iniciales, alcanzándose máximos a las 5 horas (Bryant y Robinson, 1968), 9 – 12 horas (Dehority *et al.*, 1989); 12 - 16 horas tras la ingesta (Warner, 1966c; Leedle *et al.*, 1982). En animales alimentados *ad libitum* la evolución de las poblaciones bacterianas seguía un patrón similar al de animales alimentados una vez al día (Warner, 1966a), pero el patrón era diferente en animales alimentados a intervalos regulares, los cuales presentaban una mayor estabilidad de la población bacteriana (Warner, 1966b). En estudios de poblaciones concretas, Denman y McSweeney (2006) no observaron, utilizando RT-qPCR, cambios importantes a lo largo del día en la biomasa de *R. flavefaciens* en el rumen de vacuno mientras que las de *F. succinogenes* y hongos sí experimentaron considerables variaciones 4 horas después de la toma de alimento, con picos máximos en la densidad poblacional y biomasa fúngicas a las 12 horas tras la alimentación Sin embargo, parece que la degradación de la fibra alcanza valores máximos horas más tarde de que se alcance el máximo crecimiento de los

organismos celulolíticos, en torno a las 96 horas tras la ingestión de alimento (Koike *et al.*, 2003a).

La evolución de las poblaciones bacterianas a lo largo del día, como respuesta a la entrada del alimento, puede ir acompañada de cambios en otros grupos microbianos. Swain *et al.* (2006) observaron una cierta sincronización en las variaciones de bacterias y de fagos.

2.2.9.3. pH ruminal y dieta

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que las concentraciones bacterianas son mayores en animales alimentados con dietas que incluyen una elevada cantidad de concentrado, indicando que el número de bacterias tiende a subir cuando aumenta la disponibilidad de energía. No obstante, otros trabajos proporcionan valores similares o más elevados en animales que reciben dietas ricas en forraje, en comparación con dietas ricas en concentrado. Los diferentes resultados entre estudios pueden deberse a la cantidad efectiva de concentrado y forraje que ingieren los animales, la frecuencia y nivel de alimentación, la hora de muestreo y también a un efecto del animal. No obstante, diversos trabajos no han mostrado un efecto de la frecuencia de alimentación sobre las concentraciones bacterianas, aunque sí parece existir un efecto del nivel de alimentación (Dehority y Orpin, 1997). La fase fenológica del pasto que ingiere el animal también puede tener un impacto en las concentraciones bacterianas: diferentes autores han encontrado mayores densidades bacterianas en animales alimentados con pastos de verano que aquellos alimentados con pastos de invierno, diferencias que se atribuyen a las que existen en cuanto al contenido de nitrógeno en los pastos comparados (Hobson *et al.*, 1976; Orpin *et al.*, 1985). Comparando pastos frescos y alimentos fibrosos, más secos, o ensilados, se han observado con estos últimos menores concentraciones de bacterias. Por otro lado, es probable que el volumen total de contenido ruminal juegue un cierto papel: puesto que los animales alimentados con mayor cantidad de forraje presentan mayores volúmenes de contenido ruminal, puede tener lugar un cierto efecto de dilución de la masa microbiana en estos casos (Dehority y Orpin, 1997).

Por lo que respecta a especies o grupos microbianos concretos se han observado variaciones debidas a la ingestión de dietas con elevadas proporciones de concentrado, las cuales incrementan la producción de AGVs y disminuyen el pH. Las bacterias celulolíticas son especialmente sensibles a la disminución del pH del medio (Stewart *et al.*, 1997), aunque ciertos autores no han encontrado cambios significativos en sus densidades cuando el pH desciende de forma gradual (Mackie *et al.*, 1978) e incluso cuando éste alcanza valores muy bajos (Khafipour *et al.*, 2009; Palmonari *et al.*, 2010). El descenso del pH en el rumen, sin embargo, sí reduce la digestibilidad de la fibra, probablemente como consecuencia de una disminución de la adhesión de las bacterias celulolíticas a las partículas, las cuales son preferentemente colonizadas por microorganismos ácido-tolerantes, degradadores de otros nutrientes (Mouriño *et al.*, 2001). La acidificación del contenido ruminal afecta al crecimiento de los hongos (Gordon y Phillips, 1989; Kamra *et al.*, 2003) ya que la presencia de niveles elevados de carbohidratos solubles en la dieta limita el crecimiento del micelio fúngico e inhibe de forma importante la producción de zoosporas. Una fuerte y rápida acidificación del rumen puede limitar también el crecimiento de los protozoos (Látal *et al.*, 2007). Cuando el descenso del pH es menos acusado y tiene lugar de forma gradual, la densidad de protozoos aumenta debido a la mayor disponibilidad de carbohidratos solubles (Mackie *et al.*, 1978; Goad *et al.*, 1998). Por el contrario, las dietas fibrosas estimulan el crecimiento de bacterias celulolíticas y de hongos (Kamra *et al.*, 2003) y, al generar una mayor cantidad de acético, y por tanto de hidrógeno, pueden estimular el crecimiento de los microorganismos metanogénicos (van Soest, 1994).

La composición en especies de la comunidad bacteriana ruminal puede variar en función de la dieta que recibe el animal, existiendo un predominio de bacterias Gram negativas en animales alimentados con dietas ricas en forraje y un predominio de Gram positivas en aquellos alimentados con raciones ricas en grano (Hungate, 1966). Un descenso gradual de pH, asociado al cambio de dieta de forraje a otra de grano, provoca un cambio en las abundancias relativas de las especies bacterianas ruminales. Los primeros en aumentar su número son los microorganismos amilolíticos, seguidos de las bacterias utilizadoras de lactato, que retiran este ácido del medio y ayudan a evitar una acidosis en el rumen. Tanto en el

caso de los organismos productores como en el de los que utilizan lactato, se observa una sustitución progresiva de especies sensibles a bajos pH por otras más tolerantes (Mackie *et al.*, 1978; Mackie y Gilchrist, 1979; Goad *et al.*, 1998). Otros trabajos también han encontrado un cambio en las abundancias relativas de diferentes taxones bacterianos, en el contenido ruminal completo (Tajima *et al.*, 2000; Kocherginskaya *et al.*, 2001; Khafipour *et al.*, 2009) o en las fracciones BAS y BAL (Larue *et al.*, 2005), como consecuencia de un cambio en la alimentación de forraje a grano. El efecto de la relación forraje:concentrado en la dieta sobre la riqueza y diversidad bacterianas en el rumen es controvertido. Sun *et al.* (2010) han observado una reducción en la diversidad bacteriana, determinada por DGGE, al pasar de una dieta rica en heno a otra rica en concentrado. Larue *et al.* (2005), aplicando RISA y DGGE, también observaron mayor diversidad bacteriana en animales alimentados con heno que con una mezcla de heno y grano. Por el contrario, Kocherginskaya *et al.* (2001), mediante DGGE, encontraron mayor diversidad en animales alimentados con una dieta rica en grano que en aquellos alimentados con forraje. Tales discrepancias podrían explicarse si se tiene en cuenta la composición o calidad de los componentes de la dieta y no solo sus proporciones relativas. Así, se ha observado que la calidad del forraje puede tener un efecto sobre la diversidad de las poblaciones que se adhieren a las partículas. Martínez *et al.*, (2010b) encontraron mayor diversidad bacteriana en los pellets BAS de animales alimentados con mezclas forraje:concentrado que incluían heno de hierba, que en aquellos alimentados con mezclas que contenían heno de alfalfa. Otros autores han puesto de manifiesto que algunas cepas de *F. succinogenes* y algunos hongos presentan una mayor preferencia por degradar forrajes de baja calidad (Denman y McSweeney, 2006; McSweeney y Denman, 2007). También en otros estudios se han observado diferencias en la composición de taxones bacterianos entre animales alimentados con forrajes diferentes (Koike *et al.*, 2003b). La capacidad de prospección de la técnica empleada también puede tener un cierto impacto. Según Firkins y Zu (2006), para tener un 50% de posibilidades de detectar una especie bacteriana poco abundante en rumen, se necesitarían secuenciar 50.000 clones. El empleo de técnicas de secuenciación de nueva

generación, capaces de generar una gran cantidad de secuencias a bajo coste, podría ayudar a aclarar este aspecto.

2.2.9.4. Interacciones microbianas

Las interacciones microbianas que tienen lugar en el rumen, debido a su complejidad, han sido estudiadas casi exclusivamente mediante cultivos *in vitro*, en los que pueden controlarse variables tales como los sustratos o factores de crecimiento suministrados y determinarse fácilmente los productos finales de las fermentaciones. Las interacciones pueden ser tanto positivas como negativas, pudiendo ser beneficiosas para ambas partes (mutualismo), solo para una de ellas (comensalismo) o beneficiosas para una parte y perjudiciales para la otra (predación, parasitismo, competencia, inhibición). Las principales interacciones entre microorganismos ruminales aparecen resumidas en la **Figura 2.1**.

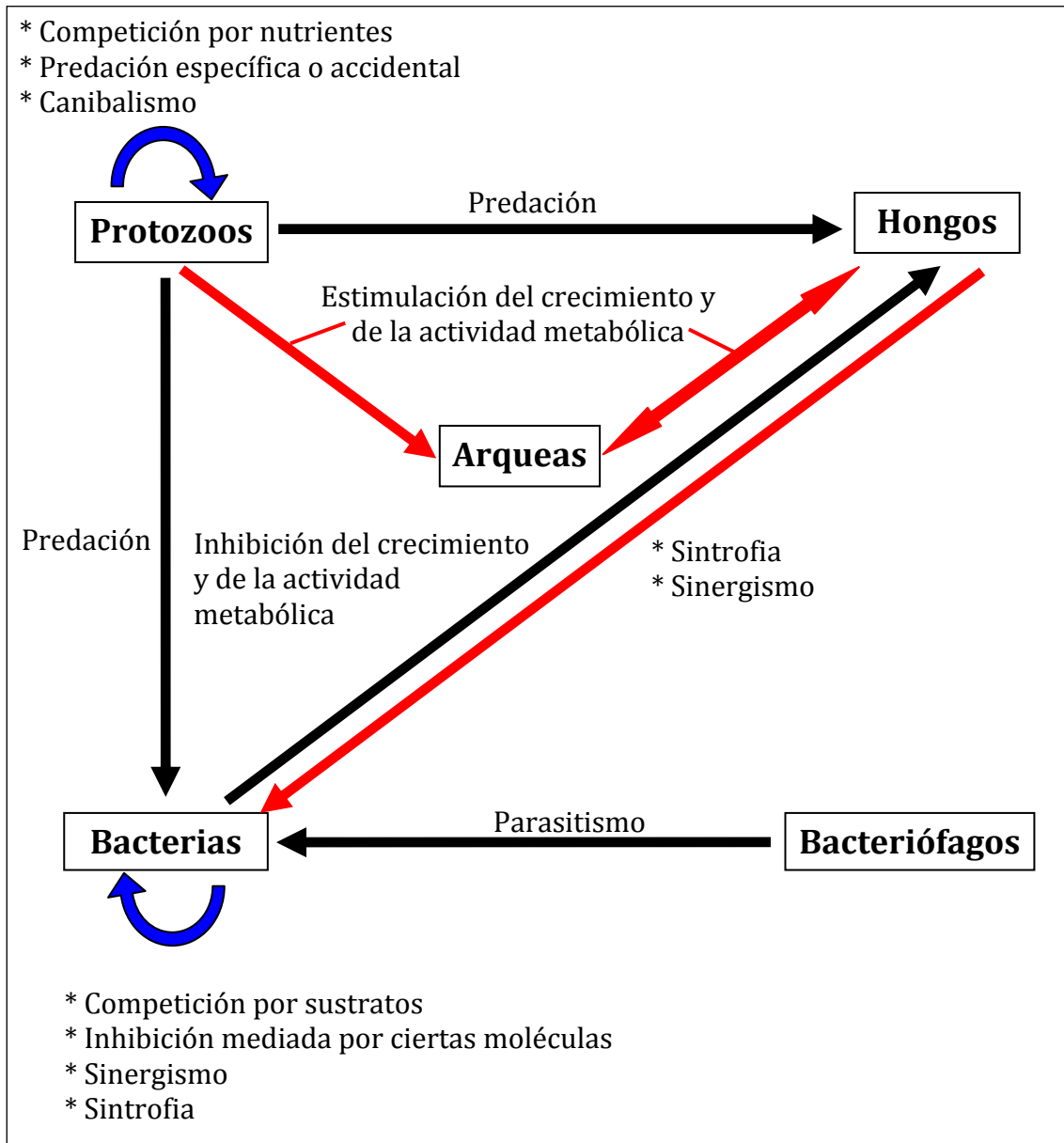


Figura 2.1. Interacciones entre los microorganismos ruminales (modificado a partir de Dehority, 1998).

Para la degradación de la fibra se requieren distintos tipos de microorganismos actuando sinérgicamente. Los primeros en actuar sobre la fibra o “fermentadores primarios” son las bacterias celulolíticas (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* y *R. albus*). Su acción enzimática libera nutrientes que estimulan y atraen a los colonizadores secundarios (Wolin *et al.*, 1997). Las bacterias celulolíticas, debido a sus bajos ritmo de crecimiento y actividad metabólica, con respecto a otras especies, compiten en desventaja por los nutrientes esenciales con otros microorganismos ruminales (Russell, 1985). No obstante, se han observado interacciones beneficiosas entre bacterias fibrolíticas y no fibrolíticas, por ejemplo *Selenomonas ruminantium* o *Treponema bryantii* (Wolin *et al.*, 1997; Koike *et al.*, 2003b), que acelerarían la degradación de la fibra. También se considera que determinados grupos microbianos, degradadores de taninos u otros compuestos recalcitrantes, podrían ayudar a mejorar la colonización y degradación de la fibra (Shinkai *et al.*, 2010). Además, algunas especies celulolíticas, para aumentar su eficacia biológica frente a otros competidores, podrían segregar sustancias inhibitorias del crecimiento denominadas bacteriocinas. Así, especies del género *Ruminococcus sp.* poseen la capacidad de inhibir el crecimiento o la actividad celulolítica de los hongos a través de la producción de estas sustancias (Bernalier *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 1992; Odenyo *et al.*, 1994; Dehority y Tirabasso, 2000). *F. succinogenes*, sin embargo, no ejerce ningún efecto sobre los hongos. Aunque la información a este respecto es escasa se sabe que también otras especies bacterianas ruminales, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Streptococcus sp.*, son productoras de bacteriocinas (Kalmokoff *et al.*, 1999; Whitford *et al.*, 2001). Por otra parte, también hay ciertos protozoos y bacterias, *Clostridium sp.* y *R. flavefaciens*, capaces de inhibir el crecimiento fúngico mediante enzimas capaces de lisar quitina (Morgavi *et al.*, 1994; Kopečný *et al.*, 1996).

Las relaciones entre bacterias y protozoos aún no están muy claras pero se sabe que sus densidades en el rumen están inversamente relacionadas. En animales defaunados, las poblaciones de hongos y bacterias aumentan, siendo las de estas últimas hasta 1,7 veces mayores que en animales faunados (Chaudhary *et al.*, 1995). No obstante, los protozoos pueden tener un efecto beneficioso indirecto sobre la actividad celulolítica en el rumen, ya que algunos de ellos albergan

bacterias en su interior o adheridas a su superficie (Orpin, 1984; Williams *et al.*, 1984). También pueden tener un efecto beneficioso sobre el pH ya que, al fagocitar gránulos de almidón, reducen la disponibilidad del mismo para las bacterias amilolíticas (Mendoza *et al.*, 1993). Por otra parte, estudios recientes en animales faunados y defaunados han puesto de manifiesto que los protozoos tienen un claro impacto sobre la composición bacteriana del rumen (Ozutsumi *et al.*, 2005; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2007).

Se han descrito interacciones entre las arqueas metanogénicas y las bacterias productoras de hidrógeno, entre metanogénicas y hongos, así como entre metanogénicas y protozoos entodiniomorfos productores de hidrógeno. Un ejemplo muy ilustrativo es la estrecha relación entre las bacterias celulolíticas productoras de H₂ (*R. albus* y *R. flavefaciens*) y las arqueas metanogénicas. Estudios realizados *in vitro* y con corderos gnotobióticos han mostrado que la presencia de arqueas metanogénicas promueve el crecimiento de las especies bacterianas celulolíticas productoras de H₂, mientras que no afectan al crecimiento de aquellas, como *F. succinogenes*, que no lo producen como metabolito final de la degradación de fibra (Martin *et al.*, 2010). Los protozoos ciliados y las arqueas metanogénicas están también relacionados de una forma importante, ya que estas últimas, al estar adheridas o en el interior de los protozoos, disponen de un suministro continuo de hidrógeno (Williams y Coleman, 1997). Como se ha comentado anteriormente, esta asociación es importante hasta el punto de reducirse considerablemente la metanogénesis en ausencia de protozoos en el rumen (Santra *et al.*, 1994).

Los organismos asociados a la pared del retículo-rumen, tanto protozoos como bacterias anaerobias facultativas, desempeñan una importante función protectora al minimizar la entrada de oxígeno al rumen por difusión. Abe *et al.* (1981) observaron que los protozoos holotricos podían ser retenidos en las paredes del retículo-rumen durante unas horas tras la ingesta de alimento, lo que Williams (1986) relacionó con su capacidad de metabolizar oxígeno, actividad que les suministraría un aporte extra de ATP. El secuestro del oxígeno y el aporte de hidrógeno, por parte de los protozoos holotricos, tendría un efecto protector y beneficioso sobre las poblaciones de arqueas metanogénicas (Hillman *et al.*, 1988, 1989).

2.3. SISTEMAS DE SIMULACIÓN DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL

2.3.1. Tipos y aplicaciones de los sistemas de simulación

El estudio de la fermentación ruminal, los microorganismos que la llevan a cabo y sus productos finales es sumamente complejo. La realización de ensayos *in vivo* para llevar a cabo el estudio de la fermentación ruminal presenta ciertos inconvenientes. Las principales fuentes de variabilidad en este tipo de experimentos son tanto las unidades experimentales (los animales) como las condiciones en que transcurren los experimentos, las cuales pueden ser difícilmente reproducibles en distintos ensayos (Kitessa *et al.*, 1999). Por otra parte, los experimentos *in vivo* presentan un alto costo económico y una cierta complejidad, puesto que requieren el mantenimiento de los animales experimentales y son laboriosos, y, además, no permiten el ensayo de gran número de dietas experimentales a la vez o son difíciles cuando la cantidad de un alimento es escasa (López, 2005). Para solventar estos problemas, desde hace más de un siglo, se han ido desarrollando una serie de sistemas que intentan simular la fermentación ruminal en condiciones de laboratorio más o menos controladas. La posibilidad de simplificar y la eliminación de importantes fuentes de variabilidad inherentes al ambiente ruminal, que ofrecen las técnicas de simulación, están contribuyendo a conocer mejor el ecosistema ruminal y su funcionamiento. Además, estos sistemas permiten abordar estudios que estarían desaconsejados en experimentos *in vivo* porque implican el uso de organismos modificados genéticamente (Koch *et al.*, 2006), dietas con un solo componente (Crawford *et al.*, 1983) o que contienen sustancias que pueden resultar tóxicas para el animal (Seeling *et al.*, 2006; Strobel *et al.*, 2008).

Los sistemas *in vitro* permiten simular la fermentación que tiene lugar en el rumen, con diferentes grados de complejidad. Por analogía a la compartimentación de la microbiota en el rumen, un cultivo no renovado de microorganismos ruminales sería un sistema de simulación uni-compartimento, mientras que un dispositivo más complejo, como un fermentador de flujo continuo o semi-continuo, permitiría una multi-compartimentación (Cheng y McAllister, 1997). La conveniencia del empleo de unos u otros depende, en gran medida, del objetivo que se pretenda alcanzar. Así, es más conveniente usar los sistemas más sencillos

para ensayos preliminares o bien para trabajos de monitorización o valoración nutritiva y los sistemas de diseño más complejo para estudios básicos de la función ruminal (Czerkawski, 1986c). Los sistemas más simples permiten disponer de un mayor número de réplicas en cada experimento y su coste, manipulación y variabilidad de los resultados obtenidos es menor (Czerkawski, 1986c). Los fermentadores de flujo continuo o semicontinuo permiten la realización de estudios más complejos. Estos sistemas han permitido abordar el estudio de procesos clave en la dinámica ruminal como el metabolismo del nitrógeno (Cotta y Russell, 1982; Calsamiglia *et al.*, 1995) y de los ácidos grasos y su biohidrogenación (Fellner *et al.*, 1995; Qiu *et al.*, 2004); y también del impacto de diversos factores sobre la fermentación y crecimiento microbiano: la fuente de nitrógeno (Griswold *et al.*, 2003; Bach *et al.*, 2008) o de carbohidratos (Bach *et al.*, 1999; Hoover *et al.*, 2006), el efecto del pH (Calsamiglia *et al.*, 2008), de las tasas de dilución de líquidos y sólidos (Hoover *et al.*, 1984; Martínez *et al.*, 2009), de la relación alimento/*tampón* (Cantalapiedra *et al.*, 2011), de distintos compuestos naturales como aceites esenciales (Castillejos *et al.*, 2005, 2006), de extractos vegetales (Broudiscou *et al.*, 2000; Cardozo *et al.*, 2004), de levaduras (Dawson *et al.*, 1990; Newbold *et al.*, 1995), de enzimas (Yang *et al.*, 2002; Colombatto *et al.*, 2007) y de ciertos residuos agroindustriales (Durand *et al.*, 1988; Martín-García *et al.*, 2006; Soder *et al.*, 2007; Molina-Alcaide *et al.*, 2009b).

A pesar de sus evidentes ventajas, las técnicas de simulación presentan ciertos inconvenientes. Su empleo sigue requiriendo animales donantes de inóculo, aunque en menor número que el que se requiere para ensayos *in vivo*, lo que implica costes en cirugía y cuidado y mantenimiento de los animales. Además, es difícil simular diversos factores como la absorción de los productos de la fermentación a través de la pared del rumen, las tasas variables de paso del alimento y del líquido, las interacciones entre hospedador y microorganismos y los niveles de determinados microorganismos, especialmente de los protozoos. Por otra parte, existen ciertas dificultades técnicas, como la imposibilidad de reproducir el elevado contenido de materia seca que hay en el rumen.

Los sistemas de simulación de la fermentación pueden clasificarse en base a diversos criterios (Czerkawski, 1986c; Blanchart *et al.*, 1989): que los gases

liberados durante la fermentación escapen al ambiente o circulen a lo largo de todo el sistema (sistemas abiertos o cerrados), que exista o no intercambio de sólidos y líquidos (sistemas renovados o no renovados), que dispongan o no de membranas semipermeables y, que el suministro de alimento y de medio de cultivo se produzca de forma sostenida durante un periodo relativamente largo - al menos 1 semana - (sistemas continuos) o transcurra en un corto periodo de tiempo - desde unas horas hasta unos pocos días - (sistemas discontinuos).

2.3.2. Determinación de la digestibilidad *in vitro*

Existen diversos procedimientos *in vitro* para estimar la digestibilidad de los nutrientes de alimentos para rumiantes. En todos ellos la determinación de la digestibilidad se basa en la cuantificación de la desaparición de un determinado nutriente tras un tiempo de incubación. Algunas de estas técnicas se basan en la solubilidad de los distintos componentes del alimento en una disolución detergente (van Soest *et al.*, 1991); otras, en el empleo de enzimas comerciales, idénticas a las presentes en rumen (Jones y Hayward, 1975; Jones y Theodorou, 2000); algunas simulan el proceso digestivo en el animal mediante el empleo de inóculo ruminal. Los primeros sistemas que empleaban inóculo ruminal datan de principios del siglo XX. Consistían en recipientes de vidrio donde se incubaban, durante un corto periodo de tiempo, diferentes sustratos con filtrado del contenido del rumen sin ningún tipo de tampón, en condiciones de anaerobiosis y temperatura similares a las del rumen. Más adelante, los sistemas se hicieron más complejos, empleándose disoluciones tampón que permitían llevar a cabo incubaciones más prolongadas, aunque la digestión se realizaba en un solo paso en muchos de ellos (Donefer *et al.*, 1960; Smith *et al.*, 1971). Otros investigadores añadieron una digestión enzimática (Tilley y Terry, 1963) o solubilización en detergente neutro (Goering y van Soest, 1970). Los sistemas más recientes implican la incubación del sustrato, contenido en sacos de poliéster, en frascos de fermentación con inóculo ruminal y una posterior solubilización del residuo en disoluciones de detergentes neutro y ácido (Ammar *et al.*, 1999; Adesogan, 2002).

También es posible evaluar la digestibilidad de una dieta mediante procedimientos *in silico*, métodos físicos (Givens *et al.*, 1997) e incluso mediante ecuaciones empíricas, si se conoce la digestibilidad de los componentes de la misma (Minson, 1982). No obstante, las estimaciones matemáticas no tienen en cuenta factores tales como el tamaño de las partículas de alimento y los efectos asociativos entre diversos componentes de la dieta (Kitessa *et al.*, 1999), que pueden modificar la digestibilidad de sus nutrientes.

El procedimiento de Tilley y Terry (1963) es uno de los más empleados en todos los laboratorios. Comprende 2 fases: incubación de las muestras en un inóculo ruminal durante 48 horas y digestión posterior, en una solución de pepsina-HCl, durante otras 48 horas para simular la digestión que tiene lugar en el abomaso. La digestibilidad aparente de un determinado nutriente se estima como la desaparición gravimétrica de dicho nutriente tras las dos fases de incubación. El método de Goering y van Soest (1970) permite estimar la digestibilidad verdadera, ya que el detergente neutro empleado elimina fracciones del residuo, insolubles en pepsina, tales como paredes bacterianas y fracciones fibrosas. Para cotejar la actividad microbiana del inóculo empleado deben incubarse 2 ó más estándares de digestibilidad conocida. Para aumentar el rendimiento y la precisión en la determinación de la digestibilidad de la materia seca, se puso a punto el incubador Daisy^{II} (ANKOM Technology), que permite la incubación simultánea de hasta 100 muestras. Algunos autores han puesto a punto un nuevo protocolo para estudiar la digestibilidad de la proteína utilizando también el incubador Daisy^{II} (Gargallo *et al.*, 2006). Con el sistema Daisy^{II} es posible predecir, de una forma bastante precisa, la digestibilidad aparente de la materia seca de la mayoría de los alimentos para rumiantes. Spanghero *et al.* (2003) encontraron una alta correlación entre los resultados de degradabilidad obtenidos *in situ* y los de digestibilidad obtenidos *in vitro*, así como bajos coeficientes de variación en el sistema Daisy^{II}. Los valores obtenidos aplicando el procedimiento de Tilley y Terry (1963) parecen más precisos que los obtenidos al aplicar otros métodos, como la solubilización en pepsina-celulasa (Gasa *et al.*, 1989). No obstante, los valores de digestibilidad *in vitro* de alimentos de baja calidad son menos exactos (Armstrong *et al.*, 1989; Khazaal *et al.*, 1993; Nsahlai y Umunna, 1996), probablemente porque 48 horas de

incubación no sean suficientes para permitir un buen desarrollo de microorganismos fibrolíticos y, en consecuencia, la adecuada degradación de este tipo de alimentos. Para paliar estos problemas, algunos autores proponen suministrar a los animales donadores del inóculo ruminal una dieta similar a aquella cuya digestibilidad *in vitro* quiere determinarse (Kitessa *et al.*, 1999).

La técnica de Tilley y Terry tiene un potencial limitado en tanto que no proporciona información acerca de la cinética de degradación en el rumen (dos muestras de alimento pueden presentar la misma degradabilidad después de 48 ó 96 horas de incubación, pero su velocidad de degradación puede haber sido completamente diferente). Algunos autores han adaptado el sistema para estimar la tasa de degradación de la materia seca y otras fracciones de los alimentos, sometiendo a las muestras a diferentes tiempos de incubación (Mould y Nordheim, 1998).

2.3.3. Determinación de la degradabilidad y de los parámetros de la fermentación ruminal

2.3.3.1. Cultivos no renovados de microorganismos ruminales

Un sistema de fermentación no renovado es aquel en el que el suministro del alimento tiene lugar solo una vez, al principio de la incubación, y no existe renovación del medio de cultivo ni salida de los productos de fermentación, por lo que el crecimiento de los microorganismos se detiene cuando se agota el sustrato. Consisten en tubos o botellas de vidrio en los que se incuba, durante cierto tiempo, un sustrato determinado con una mezcla de inóculo microbiano y una disolución mineral, reductora (para minimizar la concentración de oxígeno en el medio) y amortiguadora (para mantener constante el pH óptimo para la actividad microbiana). La degradabilidad del sustrato incubado se estima por su desaparición gravimétrica durante el periodo de incubación. Los gases generados (CO₂ y CH₄) en la fermentación del sustrato proceden, fundamentalmente, de la degradación de los carbohidratos y son productos finales de las reacciones de síntesis de ácidos grasos volátiles pero no de biomasa microbiana (Rymer *et al.*, 2005). La fermentación de las proteínas produce menor cantidad de gas que la de

los carbohidratos y la de las grasas, prácticamente valores nulos (López, 2005). Los cultivos no renovados son muy útiles para aquellos experimentos en que se dispone de un gran número de tratamientos experimentales y/o de poca cantidad de la muestra a estudiar (Tamminga y Williams, 1998).

Los primeros autores en establecer una relación entre la degradabilidad o fermentación de un sustrato y la cantidad de gas producido fueron McBee (1953) y Hungate (1966). Para llevar a cabo la medición de este gas, ciertos autores diseñaron distintos tipos de manómetros hidráulicos (Trei *et al.*, 1970; Jouany y Thivend, 1986; Beuvink y Spoelstra, 1992; Beuvink *et al.*, 1992). Otros, sin embargo, llevan a cabo la medición directa del gas a partir del desplazamiento del émbolo en jeringas de vidrio en las que se incubaba el sustrato (Czerkawski y Breckenridge, 1975; Menke *et al.*, 1979; Blümmel y Ørskov, 1993). En otros estudios se mide la presión del gas acumulado en la parte superior de los frascos de incubación, bien manualmente (Wilkins, 1974; Theodorou *et al.*, 1994) bien de forma automática o semi-automática (Pell y Schofield, 1993; Cone *et al.*, 1996; Mauricio *et al.*, 1999; Davies *et al.*, 2000). Los datos de presión acumulada, del tiempo de liberación del gas y/o del número de veces que se lleva a cabo el muestreo pueden grabarse y emplearse para construir una cinética de producción de gas.

La degradabilidad de un sustrato puede estimarse a partir de su composición química y de la producción de gas (CO₂ y CH₄) generada por su fermentación *in vitro*, tras un periodo determinado de tiempo – 24, 48 ó 72 horas (Menke *et al.*, 1979). Algunos autores señalan que estos métodos solo pueden predecir parcialmente la degradabilidad de un sustrato puesto que la producción de gas es un índice tan solo de aquella parte de la materia seca degradada que es fermentada y no de la que se incorpora a la biomasa microbiana (Rymer *et al.*, 1995; Kitessa *et al.*, 1999). Las proporciones de gases, AGVs y biomasa microbiana generados por la degradación de un sustrato varían según la naturaleza del mismo (Blümmel *et al.*, 1997). Otro aspecto a tener en cuenta es que el gas producido también procede de la liberación de CO₂ por el bicarbonato disuelto en la solución mineral-tampón (Theodorou *et al.*, 1998) y de la lisis de biomasa microbiana y su fermentación (Cone, 1998).

La degradabilidad de la proteína en los cultivos no renovados se podría estimar a partir de los valores de amonio del medio. No obstante, puesto que la concentración de amonio en un momento determinado representa el balance entre la degradación de la proteína y su utilización para la síntesis de proteína microbiana, es difícil llevar a cabo una buena estimación de los valores de degradabilidad de este nutriente. Para resolver este problema, Broderick (1987) empleaba inhibidores de la captación de amonio y de la desaminación (sulfato de hidrazina y cloranfenicol), y otros autores empleaban controles para tener en cuenta la incorporación de amonio a la proteína microbiana (Vérité y Demarquilly, 1978; Raab *et al.*, 1983).

La producción de gas puede estar influenciada por diversos factores (Rymer *et al.*, 2005) como la liberación o no del gas acumulado a lo largo de la incubación, la presión atmosférica, el modo de agitación del cultivo, la cantidad de sustrato y el estado del mismo (el tamaño de sus partículas y la humedad de la muestra), el inóculo ruminal, el tampón, el sistema de incubación y medida de gas empleados así como la utilización o no de blancos para corregir la producción de gas, etc.

2.3.3.2. Fermentadores de flujo continuo

Se trata de cultivos renovados, en los que el alimento y la solución tampón, generalmente saliva artificial, se suministran a intervalos regulares. Son capaces de mantener un crecimiento microbiano constante y similar al que tiene lugar en el rumen. Pueden ser cultivos en los que el alimento se suministra a intervalos regulares y continuos, a los que se denomina “sistemas o fermentadores continuos” (Hoover *et al.*, 1976a, b; Miettinen y Setälä, 1989), o cultivos en los que el alimento se suministra de forma intermitente, denominados “sistemas o fermentadores semi-continuos” (Czerkawski y Breckenridge, 1977). En los fermentadores de flujo continuo existe una entrada regular de solución tampón y de sustrato, y salida continua de efluente líquido y sólidos degradados. Los primeros sistemas continuos fueron los de Adler *et al.* (1958) y Slyter *et al.* (1964) y, gracias a su capacidad para mantenerse operativos durante varias semanas, permitieron estudiar la adaptación de la población microbiana establecida en el sistema *in vitro*

a determinadas condiciones o tratamientos. Los fermentadores de flujo continuo pueden ser de flujo simple (FFCS, Miettinen y Setälä, 1989), en los que el sólido y el líquido salen conjuntamente y de flujo doble (FFCD, Hoover *et al.*, 1976a, b), en los que sólidos y líquidos mantienen tasas de dilución diferentes y tienen salidas diferentes. Algunos sistemas permiten la estratificación de las fracciones sólida y líquida en el interior del vaso de fermentación (Teather y Sauer, 1988; Fuchigami *et al.*, 1989; Muetzel *et al.*, 2009). Los sistemas estratificados y los de flujo doble tratan de mantener estables las comunidades microbianas más sensibles a velocidades de flujo elevadas. Entre los sistemas de flujo semicontinuo destaca el denominado “Rusitec” (Rumen Simulation Technique; Czerkawski y Breckenridge, 1977). En este sistema la solución tampón se infunde de forma continua, el alimento entra y sale del sistema de forma escalonada (habitualmente una vez al día) y existe una salida continua del efluente líquido. Existen también sistemas de simulación de la fermentación ruminal que son intermedios entre los sistemas discontinuos y semi-continuos, en los que la entrada y salida del medio de cultivo y del alimento incubado se llevan a cabo de forma intermitente y manual (Fondevila y Pérez-Espés, 2008).

Diversos estudios comparativos han puesto de manifiesto el potencial de los sistemas continuos y semi-continuos para simular buena parte de los parámetros de la fermentación que tiene lugar *in vivo* (Slyter y Putnam, 1967; Hannah *et al.*, 1986; Mansfield *et al.*, 1995; Gizzi *et al.*, 1998; Ziemer *et al.*, 2000; Devant *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004; Rotger *et al.*, 2006; Cantalapiedra-Hijar, 2009; Carro *et al.*, 2009; Molina-Alcaide *et al.*, 2009b; Muetzel *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2010a, b). Las discrepancias encontradas entre los sistemas continuos o semi-continuos y el rumen parecen deberse a la imposibilidad de simular correctamente la multitud de factores que caracterizan el complejo ecosistema microbiano ruminal (el pH y su evolución, las tasas de dilución de sólidos y líquidos, la estratificación de distintas fases del contenido ruminal, la producción de saliva, la absorción de los AGVs, el reciclado de la urea, el aporte endógeno de proteína microbiana, etc.). La falta de control de esos factores, en los fermentadores, ejerce un efecto sobre la microbiota.

2.3.4. Poblaciones microbianas en los sistemas *in vitro*

Diversos trabajos comparativos de las comunidades microbianas establecidas en el rumen y en los fermentadores han mostrado importantes diferencias en la abundancia de microorganismos (Slyter y Putnam, 1967; Mansfield *et al.*, 1995; Ziemer *et al.*, 2000; Muetzel *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2010b) así como en la estructura de las poblaciones bacterianas (Cantalapiedra-Hijar, 2009; Martínez *et al.*, 2010b). Ello se debe a la eliminación de una buena parte de las bacterias adheridas a las partículas del alimento durante el proceso de filtrado que se lleva a cabo para preparar el inóculo ruminal. Ensayos *in vitro*, realizados con contenido ruminal íntegro, mostraron tasas de digestión y de producción de ácidos grasos más elevadas, y también más similares a las obtenidas *in vivo* (Craig *et al.*, 1984). No obstante, no filtrar el contenido del rumen para preparar el inóculo dificulta su introducción en el frasco de fermentación y provoca interferencias entre las partículas sólidas del contenido del rumen y las del sustrato incubado, que han de tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados (Craig *et al.*, 1984). Por ello, ciertos autores han puesto a punto protocolos para enriquecer el filtrado del contenido ruminal con bacterias asociadas a partículas mediante diversos procedimientos: homogeneizado del contenido ruminal en batidora antes de filtrar; una segunda filtración del residuo sólido del primer filtrado tras haberlo resuspendido en una disolución tamponadora; aplicando tratamientos físicos que favorecen el desligado de las bacterias, como enfriar a baja temperatura (0 - 4°C) durante varias horas, o someter el contenido ruminal a golpeteo mecánico (Dehority y Grubb, 1980; Craig *et al.*, 1984; Theodorou *et al.*, 1994; Griswold *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2004; Fondevila y Pérez-Espés, 2008). La aplicación de algunos de estos procedimientos ha incrementado las tasas de degradación de los sustratos y de producción de gases, AGVs, etc. en ciertos estudios (Senshu *et al.*, 1980; Mertens y Weimer, 1998), mientras que en otros no se han observado mejoras (Craig *et al.*, 1984; Pell y Schofield, 1993; Rymer *et al.*, 1999). Esto puede deberse a que el incremento de células microbianas viables no sea siempre lo suficientemente elevado como para producir cambios significativos en la degradación de los sustratos (Craig *et al.*, 1984), probablemente por una exposición prolongada de los microorganismos ruminales al oxígeno, durante el tratamiento del contenido

ruminal (Pell y Schofield, 1993), o a que el procedimiento sea demasiado agresivo con ciertos grupos microbianos. Por ejemplo, el mezclado en batidora podría lisar las células más grandes, como son los protozoos (Craig *et al.*, 1984). Otros autores han estudiado la posibilidad de sustituir el inóculo ruminal por material fecal, aunque se obtienen valores inferiores de producción de gas con respecto al inóculo ruminal (Mauricio *et al.*, 2001; Cone *et al.*, 2002). Además, la actividad microbiana de este tipo de inóculos es más baja (Rymer *et al.*, 2005). Para corregir las diferencias, se han propuesto ecuaciones que permitan aproximar los valores de producción de gas obtenidos con heces y con inóculo ruminal (Dhanoa *et al.*, 2004).

Durante la incubación *in vitro* del inóculo ruminal, los microorganismos más afectados son los protozoos, que en el caso de los fermentadores de flujo continuo experimentan una importante disminución e, incluso, desaparecen tras varios días de incubación (Slyter y Putnam, 1967; Hoover *et al.*, 1976a; Hannah *et al.*, 1986; Mansfield *et al.*, 1995; Moumen *et al.*, 2009; Muetzel *et al.*, 2009). Martínez *et al.* (2010b) observaron, además, que la composición de la comunidad protozoaria en Rusitec era diferente a la del contenido ruminal, por desaparición de determinadas especies durante el proceso de incubación. La desaparición de los protozoos parece deberse sobre todo a su lenta velocidad de crecimiento (Czerkwaski y Breckenridge, 1977; Mansfield *et al.*, 1995), aunque puede que también a la exposición ocasional de los fermentadores al oxígeno durante su manipulación (Hillman *et al.*, 1991; Abe e Iriki, 1978; Mansfield *et al.*, 1995). Un tiempo de permanencia más prolongado de la fracción sólida en el fermentador podría contribuir a retener a los protozoos. En este sentido, se puede recurrir a distintas estrategias, como reducir la agitación y permitir la estratificación (Teather y Sauer, 1988; Fuchigami *et al.*, 1989; Hino *et al.*, 1993; Muetzel *et al.*, 2009), así como mantener tasas de renovación de líquidos y sólidos adecuadas para que los protozoos se reproduzcan, pero sin comprometer la retirada efectiva de los productos de la fermentación (Teather y Sauer, 1988).

Las bacterias que se desarrollan en los sistemas *in vitro* se asemejan más a las presentes en la fase líquida del rumen, no solo por la eliminación de aquellas especies de la fracción sólida, al filtrar el contenido ruminal, sino también por otros factores asociados al cultivo *in vitro*: una menor cantidad de sólidos con

respecto al rumen, menor tamaño de las partículas sólidas y la agitación constante del contenido incubado. En el rumen, por existir más partículas sólidas y de mayor tamaño, predominan las bacterias asociadas a la fase sólida (Martín-García, 2001). Cantalapiedra-Hijar (2009) encontró diferencias en la composición bacteriana entre muestras del contenido ruminal de caprino y muestras del contenido de FFCS, aunque no observó ninguna discrepancia en los valores de biodiversidad. Martínez *et al.* (2010b) también observaron diferencias en la estructura de los consorcios bacterianos de las fracciones BAS y BAL entre el contenido del rumen de ovino y el de los fermentadores Rusitec. Sin embargo, la información referente a las densidades poblacionales en fermentadores es mucho más variable y, en ocasiones, contradictoria. Así, Ziemer *et al.* (2000) observaron mayores abundancias de bacterias totales, tanto expresadas de forma absoluta como relativas al contenido en ARNr total, en FFCD que en el rumen de vacuno mientras que Muetzel *et al.* (2009), también en un estudio realizado con FFCD e inóculo ruminal de vacas, observan todo lo contrario. Mansfield *et al.* (1995) no encontraron diferencias ni en las poblaciones de bacterias amilolíticas y proteolíticas ni en las de hongos, en el contenido del rumen de vacas y en el de FFCD, aunque sí valores inferiores de bacterias celulolíticas. Martínez *et al.* (2010b) observan niveles superiores de bacterias en Rusitec que en el rumen de ovejas, aunque, al igual que Mansfield *et al.*, encuentran densidades inferiores de celulolíticas en los fermentadores en comparación con el contenido ruminal. Por el contrario, Slyter y Putnam (1967) y Cantalapiedra-Hijar (2009) encontraron unas densidades bacterianas similares en rumen y fermentadores de flujo continuo. Las discrepancias observadas entre distintos trabajos pueden deberse a las distintas técnicas empleadas para la cuantificación microbiana y muestran la necesidad de seguir profundizando en el tema.

A pesar de la incapacidad de los sistemas *in vitro* para reproducir fielmente las condiciones de fermentación y las poblaciones ruminales existentes en el rumen, sí permiten comparar tratamientos en las mismas condiciones experimentales (Czerkawski y Bredenricke, 1977; Devant *et al.*, 2001). Sin embargo, algunos estudios de comparación *in vivo* – *in vitro*, que han ensayado dietas de diferente calidad, apuntan a que el potencial simulador de los fermentadores está influido

por la calidad de la dieta (Hannah *et al.*, 1986; Mansfield *et al.*, 1995; Carro *et al.*, 2009). Mansfield *et al.* (1995) y Carro *et al.* (2009) encontraron un grado de simulación de la fermentación ruminal diferente en función del contenido en carbohidratos estructurales de la ración.

2.3.5. Fuentes de variación en los sistemas de fermentación *in vitro*

Los sistemas *in vitro* están sometidos a múltiples fuentes de variación, tales como el tipo de frasco de fermentación, la composición del medio de cultivo empleado, las condiciones en las que transcurre la incubación (anaerobiosis, pH, temperatura, mezclado), la cantidad de muestra incubada, su contenido en materia seca, el grosor de las partículas, etc. (Marten y Barnes, 1980; Weiss, 1994). Las principales fuentes de variación, sin embargo, son la duración de la incubación y, sobre todo, el inóculo empleado.

2.3.5.1. Duración del periodo de incubación y adaptación a las condiciones *in vitro*

La duración óptima de la incubación en los ensayos *in vitro* depende del sistema empleado así como del objetivo perseguido. En las técnicas de determinación de degradabilidad y digestibilidad, de tipo gravimétrico, se ha establecido un tiempo óptimo de 48 horas; en las técnicas de producción de gas *in vitro*, sin embargo, se ha establecido que los mejores resultados se obtienen con incubaciones de 24 horas (López, 2005). En cualquiera de estos sistemas no tiene lugar una adaptación de las poblaciones microbianas, sino que el agotamiento del sustrato provoca el declive rápido de las mismas a partir de las 24 – 48 horas de incubación (López, 2005).

Cuando se trata de ensayos más complejos, realizados en sistemas de cultivo continuos o semi-continuos, es necesario dejar transcurrir un tiempo más prolongado para que los microorganismos ruminales se adapten a las condiciones del sistema *in vitro*, es decir, que alcancen un estado estacionario en el que la salida diaria de productos de la fermentación (AGVs, N-NH₃, biomasa microbiana) sea

estable. En los primeros días de la adaptación a la dieta en el sistema *in vitro*, es probable que se produzcan una serie de modificaciones en la abundancia y diversidad de los microorganismos. La literatura muestra importantes diferencias en la duración de este periodo de adaptación, desde 5 hasta 11 días (Mansfield *et al.*, 1994; Carro *et al.*, 1999; Busquet *et al.*, 2005; Castillejos *et al.*, 2005; Martín-García *et al.*, 2006; Moumen *et al.*, 2008; Carro *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2010a, b). La estabilización de las poblaciones puede estar determinada por el tipo de dieta que se suministre al fermentador, siendo las dietas de baja calidad las que requieren periodos de adaptación más prolongados (Czerkawski y Breckenridge, 1977, 1979). También la tasa de dilución del líquido, el tiempo de retención de sólidos y la cantidad de alimento suministrado son factores que afectan a la estabilidad del sistema (Carro *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, en prensa). Se han realizado algunos estudios en los que se monitorizaba la evolución de diversos parámetros fermentativos en sistemas continuos y semi-continuos (Cardozo *et al.*, 2004; Busquet *et al.*, 2005; Castillejos *et al.*, 2005, 2007; Martínez *et al.*, en prensa) encontrándose variaciones en el tiempo óptimo de adaptación de cada sistema, en función de diversos factores. Uno de ellos era la concentración de determinados aditivos añadidos a la dieta, que tenía un impacto en el tiempo de estabilización del sistema *in vitro* (Cardozo *et al.*, 2004; Busquet *et al.*, 2005; Castillejos *et al.*, 2005). Otro factor era el propio metabolito determinado; así se observó que para determinar la producción de ácidos grasos volátiles se requiere de un menor tiempo de adaptación (inferior a 6 días) que para metabolitos del metabolismo del nitrógeno, que pueden necesitar hasta 4 semanas para su estabilización (Molero *et al.*, 2004; Castillejos *et al.*, 2007). Martínez *et al.* (en prensa) también encontraron, en Rusitec, tiempos de adaptación óptimos de 6 días para la producción de AGVs. En este mismo trabajo se vio que la tasa de dilución del sistema afectaba al periodo de adaptación, requiriéndose tiempos menores en aquellos fermentadores con tasas de dilución más altas.

Existen pocos estudios sobre la evolución de las poblaciones microbianas durante los primeros días de incubación, en sistemas continuos y semi-continuos (Slyter y Putnam, 1967; Prevot *et al.*, 1994; Ziemer *et al.*, 2000; Muetzel *et al.*, 2009), habiéndose realizado todos ellos con inóculo ruminal de vacuno. Actualmente, no

existe ningún trabajo que haya estudiado la evolución de la microbiota ruminal de caprino en un sistema continuo. En los trabajos mencionados, realizados en vacuno, parece no existir consenso en cuanto a la dinámica de las poblaciones microbianas durante el periodo de adaptación. Prevot *et al.* (1994) y Muetzel *et al.* (2009) observaron una disminución de las densidades de las poblaciones bacterianas en Rusitec y en fermentadores de flujo continuo doble con respecto a las observadas en contenido ruminal; mientras que Slyter y Putnam (1967) y Ziemer *et al.* (2000) encontraron mayores concentraciones de células bacterianas viables o de ARNr 16S, en fermentadores de flujo continuo que en el rumen. En cuanto a las poblaciones de otros grupos microbianos también existen discrepancias. Ziemer *et al.* (2000) encuentran que las abundancias relativas (% ARNr del grupo en cuestión con respecto al ARNr total) de *Fibrobacter sp.* en rumen y en fermentadores, a lo largo de 7 días de incubación, no difieren, mientras que Muetzel *et al.* (2009) observan un aumento en las abundancias relativas de estas bacterias tras 3 días de incubación. No obstante, tanto Ziemer como Muetzel observan un incremento en las abundancias relativas de arqueas a lo largo de los primeros días de incubación en fermentadores. Probablemente, diferencias en las tasas de dilución de líquidos y de retención de sólidos entre los distintos sistemas *in vitro* determinen tales diferencias. Los trabajos mencionados concuerdan en mostrar un menor número de protozoos en fermentadores que en rumen.

2.3.5.2. Inóculo ruminal

El inóculo empleado en los ensayos *in vitro* representa la principal fuente de variación de los mismos. La composición y abundancia microbiana, así como la actividad de los microorganismos en el inóculo pueden variar considerablemente, dependiendo de la especie y raza animal a la que pertenezcan los donadores del inóculo, e incluso, del individuo, del momento del muestreo o de la dieta que el animal donador recibe (Marten y Barnes, 1980; Weiss, 1994; Kitessa *et al.*, 1999). Existe controversia sobre si el animal donante de inóculo ruminal puede ejercer o no un efecto sobre los parámetros fermentativos o poblaciones microbianas determinadas en un ensayo *in vitro*. Algunos autores han observado pocas diferencias en la digestibilidad *in vitro* (Thomas *et al.*, 1988; King y Plaizier, 2006)

o en la producción de gas (Cone *et al.*, 1996; Bueno *et al.*, 1999) con inóculos procedentes de animales de distintas especies mientras que otros autores sí las han encontrado, tanto en digestibilidad, producción de gas y de AGVs, concentración de amonio o flujo de nitrógeno (Ayres, 1991; Gonçalves y Borba, 1996; Mertens *et al.*, 1998; Martín-García *et al.*, 2003; van Gelder *et al.*, 2005).

El problema de la variabilidad entre individuos puede solucionarse fácilmente haciendo una mezcla del contenido ruminal de diferentes animales (Gulati *et al.*, 1997). Además, algunos autores han sugerido la administración, al animal o animales donantes del inóculo, de la misma dieta que se suministre al sistema *in vitro* (Bowie, 1962). No obstante, a veces, eso no es posible bien porque la dieta a estudiar incorpore sustancias tóxicas o porque se pretendan comparar distintas dietas bajo las mismas condiciones experimentales.

También existe cierta controversia en lo que se refiere al momento óptimo de muestreo del contenido ruminal para la preparación de inóculos, puesto que las concentraciones de los microorganismos del rumen experimentan cambios cíclicos marcados en relación al momento en que se suministra el alimento, como se ha comentado anteriormente (**apartado 2.2.9.2**). Debido a estas variaciones circadianas, algunos autores sugieren que la toma de contenido ruminal debería realizarse antes de alimentar a los animales (Menke y Steingass, 1988; Weiss, 1994), que es cuando existen máximos estables en las poblaciones microbianas y cuando la variación en la composición y actividad fermentativa del inóculo entre ensayos es menor. Otros autores, por el contrario, prefieren llevar a cabo el muestreo del contenido ruminal justo después de la administración del alimento (Cone *et al.*, 1996), momento en el que se produce una mayor tasa de fermentación. Payne *et al.* (2002) observaron que el perfil de producción de gases de diferentes sustratos era menos variable, entre réplicas y entre semanas, cuando el contenido ruminal se muestreaba a las 4 o a las 8 horas después de alimentar a los animales, en comparación con el muestreado justo antes ó 2 horas después del suministro del alimento.

2.4. METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE LA MICROBIOTA RUMINAL

2.4.1. Técnicas basadas en el cultivo de microorganismos

Los métodos clásicos, basados en el cultivo de microorganismos, han generado una profusa información, especialmente útil en lo referente al conocimiento de la fisiología microbiana. La “época dorada” de la microbiología ruminal se desarrolló entre los años 50 y 80 del siglo pasado (Dehority, 2003), siendo Robert Hungate quien más contribuyó al conocimiento de los microorganismos ruminales. Las técnicas más empleadas para el conteo de microorganismos eran la siembra en tubos de cultivo anaerobios (Hungate, 1973) y la técnica del número más probable (NMP; Dehority *et al.*, 1989). Para el estudio de la diversidad bacteriana, en muestras de contenido ruminal, se recurría a la determinación del perfil de fosfolípidos y ácidos grasos de la membrana celular bacteriana (Minato *et al.*, 1988) o del contenido en G+C (Ogimoto y Imain, 1981). La identificación de especies microbianas se basaba en cultivos selectivos, tinciones, observaciones al microscopio o en el estudio de sus actividades metabólicas. No obstante, a pesar de la importante información que estas técnicas han proporcionado acerca de la microbiota del rumen, existen ciertas limitaciones (Firkins y Zu, 2006): imposibilidad de contar aquellas células que, aunque pertenecen a especies cultivables, están en fase de división; errores debidos a la presencia de unidades formadoras de colonias iniciadas por conglomerados de células y no por células únicas; imposibilidad de hacer crecer todas las especies en un determinado medio de cultivo. La mayor parte de las especies microbianas ruminales no han podido cultivarse (85 – 95 %, Krause y Russell, 1996) por diversas razones (Zoetendal *et al.*, 2004): el desconocimiento de los requerimientos nutritivos y/o el uso de medios de cultivo muy selectivos; variaciones, sesgos o errores estadísticos derivados del conteo mediante cultivo o de la presencia, en los medios de cultivo, de productos intermediarios de la degradación del sustrato; problemas asociados al manejo de los cultivos que pueden representar una fuente de estrés para los microorganismos que se desea cultivar (ausencia de anaerobiosis estricta durante la inoculación o la incubación, cantidad excesiva o deficiente de sustrato o un tiempo de incubación demasiado corto).

2.4.2. Técnicas basadas en la caracterización de genes marcadores

2.4.2.1. Taxonomía filogenética

El empleo de técnicas moleculares, en el estudio de los ecosistemas del tracto gastrointestinal, ha permitido ampliar el conocimiento de la diversidad y estructura de sus comunidades microbianas así como las dinámicas poblacionales asociadas a distintos factores. En este tipo de técnicas se emplean secuencias de ADN como marcadores moleculares. El gen codificante (*rss*) del ARN de la subunidad ribosómica pequeña o SSU (*Small SubUnit*) es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía microbianas, el 16S para procariotas y el 18S para eucariotas. Su empleo, como cronómetro molecular, se inició en los años 60, década en la que se especuló sobre la posibilidad de que determinadas macromoléculas pudieran emplearse para conocer la historia evolutiva de los microorganismos (Zuckerlandl y Pauling, 1962, 1965). Posteriormente, se sugirió que la acumulación de mutaciones durante la replicación del ADN, la mayor parte de ellas neutras, dirigía el proceso de evolución molecular de los microorganismos (Sarich y Wilson, 1967; Kimura, 1968). Estas mutaciones neutras ocurren de forma relativamente constante a lo largo del tiempo y alcanzan valores similares en distintas especies microbianas. El número de mutaciones neutras, acumuladas en una secuencia nucleotídica determinada, es equivalente al tiempo transcurrido desde el momento en que dos líneas evolutivas divergen. Partiendo de estos principios, el grupo de Carl Woese, en la Universidad de Illinois (Urbana-Champaign), empleó el ARN ribosómico 16S como cronómetro molecular para la clasificación general de los organismos procariotas (Woese y Fox, 1977).

Cualquier secuencia nucleotídica no es adecuada como cronómetro o reloj molecular, ya que los genomas de procariotas y eucariotas presentan multitud de secuencias de diversa índole (génicas y no génicas) y no todas ellas pueden emplearse en los estudios de cuantificación o de ecología microbiana. El gen de la SSU presenta una serie de características que lo hacen idóneo como reloj molecular: está presente en todos los organismos procariotas (16S) y eucariotas (18S); se encuentra en el cromosoma bacteriano o eucariota y no en elementos genéticos móviles (como pueden ser los plásmidos), lo que dificulta su transmisión

horizontal; su elevada antigüedad y el alto grado de conservación de su secuencia, ya que codifica parte de la maquinaria de biosíntesis proteica, proceso esencial de mantenimiento de las células y que determina, también, que la presión selectiva haya incidido en menor grado sobre su secuencia; la coexistencia, en su secuencia, de regiones altamente conservadas y de regiones variables.

La aparición de regiones variables en el gen *rss* se debe a las mutaciones neutras que han ido acumulándose lentamente en zonas que no afectan a la función de la molécula que aquel codifica, dando lugar a la aparición de oligonucleótidos denominados “firma” en la secuencia génica. Estos cambios, además, son lo suficientemente lentos como para permitir el rastreo de la historia evolutiva de un determinado linaje de seres vivos. La presencia de regiones conservadas en el gen *rss* permite la reconstrucción de linajes mientras que las regiones variables (V1 a V9), definidas por la presencia de oligonucleótidos firma y presentes solo en determinados taxones, permiten diferenciar especies. La variación de secuencias entre especies del mismo género oscila entre el 1,5 y el 3% (Snel *et al.*, 1995).

A pesar de que el ADN ribosómico 16S es el marcador de uso más generalizado, presenta ciertos inconvenientes como la variabilidad en el número de copias del mismo en diferentes especies (entre 1- 15 copias según el organismo; Smith y Osborn, 2009) o, la dificultad para diferenciar especies muy similares genéticamente (Kim *et al.*, 2003). En el caso de los protozoos, además, parece que el número de copias de ADN ribosómico 18S puede variar en una misma célula protozoaria a lo largo de su ciclo de vida (Firkins y Zu, 2006; Sylvester *et al.*, 2004). Afortunadamente, las principales bacterias celulolíticas del rumen presentan 3 copias del 16S, lo cual permite la comparación de sus poblaciones (Tajima *et al.*, 2001a; Frey *et al.*, 2006).

Existen alternativas al gen *rss* como, por ejemplo, la región IRS1 (*Intergenic Region Sequence 1*) o región espaciadora, dentro del operón de los genes ribosómicos, que se sitúa entre el ADNr 16S y el 23S, en procariotas, y entre el 18S y el 5,8S, en eucariotas. Otros genes no relacionados con la síntesis de proteínas (Perumbakkam y Craig, 2011) pueden ser una alternativa al uso del gen *rss* aunque éste sigue siendo el de elección para estudios de ecología microbiana. Su principal

ventaja, con respecto a otras secuencias nucleotídicas, es la gran cantidad de información relativa al mismo, depositada en las bases de datos.

La producción científica mundial, referente a la secuenciación de genes y proteínas, está centralizada en grandes bases de datos que permiten realizar fácilmente búsquedas y alineaciones, simples o múltiples, de secuencias a través de herramientas bioinformáticas diversas (Entrez, BLAST, ClustalW, etc.) disponibles en los propios portales *web* que mantienen estas bases de datos. GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) es una colección de secuencias nucleotídicas, dependiente del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), incluida en una red mundial denominada INSDC (*International Nucleotide Sequence Database Collaboration*). La INSDC incluye, además, la base de datos de ADN de Japón o DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*) y la del Laboratorio Europeo de Biología Molecular o EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) conocida como "Nucleotide Database". Estas organizaciones reciben e intercambian secuencias genéticas producidas en laboratorios de todo el mundo, procedentes de más de 100.000 organismos distintos. El RDP II (*Ribosomal Database Project II*; <http://rdp.cme.msu.edu/>) es otra base de datos de secuencias, desarrollada por investigadores de la Universidad del Estado de Michigan, que contiene únicamente información de genes ribosómicos de la SSU y la LSU (*Large SubUnit*), de procariotas, eucariotas y orgánulos celulares (Cole *et al.*, 2009).

2.4.2.2. Métodos de caracterización de la diversidad microbiana

Construcción de colecciones de clones y secuenciación

Es la técnica más potente para el estudio de la diversidad microbiana. Consiste en la obtención de una colección de colonias bacterianas, portadoras de plásmidos recombinantes, en las que se ha insertado un fragmento del gen de la SSU correspondiente a una especie microbiana determinada. La identificación de la especie en cuestión se lleva a cabo mediante secuenciación del fragmento y posterior cotejado con la información disponible en las bases de datos (GenBank, RDP II). La información obtenida puede representarse en forma de árboles filogenéticos, en los que las secuencias del gen *rss* que comparten más de un 95 -

97% de similitud se agrupan en un mismo OTU (*Operational Taxonomic Unit*; Stackebrandt y Goebel 1994; Edwards *et al.*, 2004). No obstante, a veces esta consideración no basta para establecer si 2 secuencias pertenecen o no a la misma especie microbiana puesto que, en ocasiones, especies que comparten una similitud de más del 97% en el gen 16S se clasifican como diferentes, en base a diferencias en el resto del genoma y a diferencias funcionales (Edwards *et al.*, 2004). Por ello, la interrelación entre técnicas moleculares y técnicas de cultivo es esencial para llevar a cabo una adecuada identificación de especies (Roselló-Mora y Amann, 2001).

Las técnicas de clonación y secuenciación han permitido constatar que la inmensa mayoría de los taxones bacterianos detectados (89%) no se conocían por no poderse cultivar (Edwards *et al.*, 2004). También han permitido reconsiderar las clasificaciones en géneros bacterianos tales como *Prevotella sp.* o *Bacteroides sp.* (Ramšak *et al.*, 2000; Edwards *et al.*, 2004). A pesar de la valiosa información que proporciona la clonación, existen ciertos inconvenientes para su implementación. En primer lugar, se trata de una técnica muy laboriosa y costosa, puesto que el número de clones que se deben secuenciar, para conseguir una representación adecuada de la diversidad microbiana ruminal, es muy elevado, especialmente para detectar las especies poco abundantes (Dunbar *et al.*, 2002). Por otra parte, el número de OTUs encontrados en distintos estudios, así como las proporciones relativas de los mismos, con respecto al total de la comunidad microbiana, son muy variables (Edwards *et al.*, 2004). Esto puede deberse a diferencias en el número de clones secuenciados, en la región del gen 16S seleccionada para la secuenciación, el animal, la dieta recibida, etc. Por todo ello, la clonación no puede considerarse como una técnica cuantitativa. Finalmente, mediante esta técnica resulta imposible atribuir una funcionalidad a las especies no cultivables identificadas.

Existen nuevas técnicas, capaces de aumentar la capacidad de resolución de los métodos de secuenciación clásicos así como de disminuir su costo. Una de ellas es la denominada SARST (*Serial Analysis of Ribosomal Sequencing Tags*), que consiste en la incorporación de una etapa de restricción y ligado de fragmentos amplificados del 16S, para crear concátemeros que, posteriormente, se clonan y secuencian (Neufeld *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2006). En muestras del contenido del

rumen se emplea la región V1 del ARNr 16S, con mayor variabilidad interna que otras regiones hipervariables (Yu y Morrison, 2004). Puesto que un solo clon bacteriano puede albergar un concatémero formado hasta por 20 fragmentos de distintas bacterias, el análisis de la comunidad microbiana que se realiza es mayor y se abarata considerablemente su costo.

Por otra parte, los aparatos de secuenciación de última generación (Roche 454 GS FLX Sequencer, Illumina Genome Analyzer_{IX}, Life Technologies SOLiDTM Sequencer, entre otros) son capaces de leer en paralelo millones de secuencias génicas, procedentes de colecciones de fragmentos que no requieren su previa clonación en vectores génicos. El desarrollo de este tipo de tecnologías ha producido una notable disminución en el coste de cada reacción de secuenciación. Su alto rendimiento las hace idóneas para el estudio de hábitats tan complejos como el ecosistema ruminal. No obstante, tanto el elevado costo de los aparatos como la necesidad de equipos de computación potentes y de personal especializado suponen una limitación para su implantación (Mardis, 2008).

Técnicas de huella genética (“fingerprinting”)

Existen otras técnicas más rápidas, sencillas y mucho menos costosas que las basadas en la secuenciación de ADN y que permiten comparar la diversidad y estructura de la comunidad microbiana ruminal, en relación a diversos parámetros. El objetivo de estas técnicas es la caracterización de un conjunto de poblaciones microbianas determinadas (bacterias, protozoos, hongos), en un animal o sistema *in vitro*, para un tratamiento experimental concreto. Todas ellas se basan en la amplificación de una región génica, marcadora de un determinado grupo microbiano, y la posterior separación de los amplicones generados mediante electroforesis. La separación de la mezcla de amplicones se realiza en base a la longitud de los mismos (RISA, ARISA y ALH/LH-PCR), su secuencia (DGGE, TGGE, TTGE y SSCP) o la longitud de los fragmentos generados tras la digestión de los amplicones con endonucleasas de restricción (RFLP/ARDRA y T-RFLP). En algunas de estas técnicas (ARISA, T-RFLP, RAPD y ALH) la separación y detección de

fragmentos se ha automatizado mediante el empleo de equipos secuenciadores de ácidos nucleicos.

Existen, asimismo, otras técnicas que permiten evaluar la diversidad de un grupo mucho más reducido de microorganismos mediante el empleo de determinadas sondas, caso de la hibridación *dot-blot* (Stahl *et al.*, 1988; Raskin *et al.*, 1995) y la hibridación de células completas (Amann *et al.*, 1995).

A) Técnicas basadas en la separación de fragmentos génicos con la misma secuencia.

Existen una serie de procedimientos experimentales que implican la separación de amplicones, en base a su secuencia génica y no a su longitud, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con gradientes desnaturizantes (DGGE: *Denaturing Gel Gradient Electrophoresis*) o térmicos (TGGE: *Temperature Gradient Electrophoresis* y TTGE: *Temporal temperature gradient electrophoresis*) o en geles de poliacrilamida aprovechando las diferencias en el plegamiento de cadenas simples de ADN, en base a su secuencia nucleotídica (SSCP: *Single Strand Conformation Polymorphism*).

En la técnica DGGE, la separación electroforética está basada en los cambios conformacionales que experimentan las cadenas de ADN, debidos a la adición de sustancias desnaturizantes. Cuando las dobles cadenas de ADN se someten a la acción de agentes desnaturizantes químicos, presentes en el gel de poliacrilamida (urea y formamida), se produce una apertura parcial de las cadenas, pasando de una estructura helicoidal lineal a una estructura en Y o en T. Esto reduce significativamente su movilidad electroforética en la matriz polimérica del gel. Las dobles cadenas se desnaturizan con mayor o menor nivel de agentes desnaturizantes, en función de la secuencia nucleotídica que presenten. La proporción de G+C de las mismas o su distribución son fundamentales, de tal modo que las secuencias más ricas en G+C son más recalcitrantes a los agentes desnaturizantes, por lo que pueden migrar más a través de la matriz de poliacrilamida. La incorporación de un dominio en el extremo 5' de uno de los cebadores de entre 30 – 50 pb de G+C (colas GC o GC *clamp*) confiere mayor

estabilidad a los amplicones en el gel, lo que mejora la separación de los fragmentos y, por tanto, la resolución del gel (Myers *et al.*, 1985; Sheffield *et al.*, 1989). Alternativamente al empleo de colas GC, se han usado cebadores ligados a otros agentes químicos (*ChemiClamp*) que, aunque no agregan bases a los fragmentos amplificados, presentan ciertos inconvenientes (Muyzer y Smalla, 1998). La DGGE permite una separación adecuada de los amplicones de hasta unos 400 pb. La separación de fragmentos de mayor longitud es más difícil, por lo que se obtienen resoluciones peores en los geles (Fromin *et al.*, 2002). La técnica fue desarrollada por el grupo de Leonard Lerman en la Universidad Estatal de Nueva York (Fischer y Lerman, 1979, 1980) e inicialmente empleada para la detección de mutaciones en genes de interés clínico, como los codificadores de los complejos principales de histocompatibilidad (MHC). Fueron Muyzer *et al.* (2003) los primeros que emplearon la DGGE, como técnica de huella genética, para la caracterización microbiana de un ambiente complejo y, desde entonces, se utiliza para la caracterización de suelos, aguas dulces y saladas, fuentes termales, la rizosfera, el rumen, etc. (Muyzer y Smalla, 1998). Teóricamente, una banda discreta puede identificarse como un solo filotipo, correspondiente a una población microbiana (Muyzer *et al.*, 1993). La comparación de perfiles de bandas de distintas muestras es posible gracias al empleo de *software* de análisis de imagen (Quantity One, BioNumerics, etc.), que permiten asignar y alinear bandas así como determinar sus intensidades de una forma bastante objetiva, y de *software* de análisis multivariante (CAP, PHYLIP, etc.), que permiten la construcción de dendrogramas y diversos análisis de ordenación (PCA, RDA, etc.). Las regiones del gen 16S, empleadas para llevar a cabo el *screening* de una comunidad bacteriana determinada, varían según el objetivo del estudio (Yang *et al.*, 2006). Yu y Morrison (2004) compararon diferentes regiones del gen *rss*, individuales o combinaciones de ellas, observando diferentes resoluciones en los geles, así como diferencias en el número de bandas e intensidad de las mismas, lo que repercute en la estimación de la biodiversidad en las muestras estudiadas. Estos autores concluyeron que el empleo de la región V3 proporcionaba perfiles de más calidad y mejores estimaciones de diversidad cuando se aplica la técnica DGGE.

B) Técnicas basadas en la separación de fragmentos de distinta longitud. T-RFLP

Se han puesto a punto numerosas técnicas para explotar la variabilidad o el polimorfismo de determinadas secuencias génicas, tanto para la identificación de especies, cepas, razas, variedades, mutaciones génicas, como para llevar a cabo estudios de comunidades microbianas. En este último caso, las técnicas podrían clasificarse en base al polimorfismo existente en la longitud de fragmentos amplificados o de fragmentos de restricción, como RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) y RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) o ARDRA (*Amplified rDNA Restriction Analysis*), en el primer y segundo caso, respectivamente. La automatización de estas técnicas, mediante el empleo de fluoróforos, ha dado como resultado las técnicas de ARISA (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) y T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*). Existen otras técnicas alternativas, también automatizadas, como la FERP (*Fluorescently Enhanced REP - Repetitive Extragenic Palindromic Sequences - PCR*), la RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) y la ALH (*Amplified Length Heterogeneity*).

La T-RFLP fue desarrollada por Avaniss-Aghajani *et al.* (1996) para la identificación de bacterias del género *Mycobacteria* y, posteriormente, se implementó para la determinación de la diversidad y estructura de comunidades microbianas más o menos complejas (Liu *et al.*, 1997; Bruce, 1997; Clement *et al.*, 1998) empleando como gen diana, principalmente, el *rss*. Esta técnica también se ha aplicado para el *screening* de consorcios microbianos concretos, mediante el empleo de genes implicados en determinadas actividades metabólicas (Ohkuma *et al.*, 1999; Horz *et al.*, 2000; Scala *et al.*, 2000). Al igual que en la técnica RFLP, también en la T-RFLP se lleva a cabo la amplificación de un fragmento génico de interés, que después se somete a restricción, mediante endonucleasas que reconocen sitios de unos 4 pares de bases. En la técnica ARDRA, los fragmentos generados pueden separarse en un gel de agarosa, si se parte de cultivos puros o clones, o en geles de poliacrilamida si se trata de comunidades microbianas, no obteniéndose una buena resolución en el caso de comunidades complejas (Liu *et al.*, 1997). La diferencia, en el caso de la T-RFLP, estriba en que durante el proceso

de amplificación uno de los cebadores se marca con un fluoróforo. De este modo, tras digerir enzimáticamente las muestras, los fragmentos terminales marcados pueden detectarse con equipos de secuenciación mediante electroforesis (Marsh, 1999). De cada especie microbiana solo se detectará un fragmento, precisamente aquel que se ha marcado con el fluoróforo, lo que simplifica considerablemente el análisis de los datos y lo hace más objetivo (Liu *et al.*, 1997). Es posible, incluso, estudiar simultáneamente varias comunidades microbianas si se emplean diferentes parejas de cebadores en la misma PCR (*multiplex PCR*; Singh *et al.*, 2006). El tamaño de los picos de hasta 600 pb puede determinarse de forma muy precisa (Marsh, 1999). El empleo de más de una enzima de restricción aumenta la resolución del análisis (Liu *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 1998; Marsh, 1999). La *HhaI* es una de las más frecuentemente empleadas (Kitts *et al.*, 2001) habiéndose observado que proporciona una mayor cobertura del número de organismos de una comunidad, lo que evita grandes sesgos hacia determinados grupos microbianos y proporciona mejores estimaciones de la biodiversidad (Marsh, 1999) y la estructura microbiana (Clement *et al.*, 1998).

2.4.2.3. Ventajas y limitaciones de DGGE y T-RFLP

Consideraciones metodológicas

La DGGE presenta algunos problemas técnicos como la dificultad de establecer los gradientes químicos en los geles de poliacrilamida, lo cual implica que no siempre se puedan reproducir exactamente las condiciones del gel y, por tanto, comparar muestras de distintas tandas de electroforesis. Además, en ocasiones, puede ser difícil llegar a obtener una adecuada resolución o separación de las cadenas. No obstante, una estandarización optimizada del proceso puede minimizar estos problemas, y contribuir a mejorar la reproducibilidad de los análisis (Simpson *et al.*, 1999). Por el contrario, la T-RFLP, en la que el análisis de fragmentos terminales es automático y se emplean estándares internos que migran conjuntamente con cada muestra, tiene una reproducibilidad muy alta, que permite la comparación de los datos obtenidos en diferentes tandas de separación electroforética (Osborn *et al.*, 2000; Kitts, 2001). No obstante, para aumentar la

exactitud de los análisis, deben tenerse en cuenta aspectos tales como una adecuada selección de fluoróforos para marcar el ADN de las muestras y de los estándares, la influencia de la composición nucleotídica sobre la movilidad electroforética, los métodos para establecer el umbral de diferenciación entre picos y ruido electrónico y para alinear, simultáneamente, todos los perfiles de fragmentos de restricción terminales (FRTs) de las muestras consideradas en el estudio (Schütte *et al.*, 2008). La conveniencia del empleo de alturas o de áreas en los análisis de datos es controvertida (Dunbar *et al.*, 2001; Kitts, 2001; Blackwood *et al.*, 2003). Algunos autores consideran que el uso de las alturas de los picos es más conveniente que el de las áreas para evitar el solapamiento de áreas en el análisis (Blackwood *et al.*, citado por Grant *et al.*, 2003).

Asignación de bandas y picos

La identificación de bandas en el caso de la DGGE entraña ciertos problemas. Aunque, en general, bandas que migran paralelamente en diferentes carriles de un gel DGGE presentan la misma secuencia o conjunto de secuencias (Kowalchuk *et al.*, 1997), no siempre sucede así y puede ocurrir que fragmentos génicos de distinta secuencia tengan el mismo comportamiento desnaturalizante y, por tanto, migratorio (Muyzer y Smalla, 1998). Esto puede suceder con especies altamente emparentadas y, por lo tanto, con secuencias muy similares (Buchholz-Cleven *et al.*, 1997) pero también con poblaciones muy diferentes, especialmente en el caso de comunidades complejas (Kowalchuk *et al.*, 1997; Vallaeyts *et al.*, 1997). Un problema adicional es la presencia de bandas artificiales, debidas a la aparición de amplicones que son en realidad heterodúplex, es decir, formados por la hibridación de dos cadenas de distinto origen (Ferris y Ward, 1997). En la T-RFLP tampoco cada fragmento terminal puede asignarse a un único OTU o filotipo, especialmente en el caso de comunidades complejas (Blackwood *et al.*, 2007). Es importante, por ello, una buena selección de cebadores y enzimas, así como, en ocasiones, barajar la posibilidad de usar más de un cebador marcado, acotar el grupo microbiano a estudiar o llevar a cabo una PCR con varias parejas de cebadores (Schütte *et al.*, 2008). Existen diversos programas que permiten una adecuada selección de cebadores (Primer Sequence Prevalence, Probe Match), y

también de las enzimas de restricción a emplear mediante digestión *in silico* (Virtual Digest ISPaR de MiCA 3, TAP T-RFLP del RDP II, Restriction Endonuclease Picker) de secuencias nucleotídicas depositadas en las base de datos. Una especie bacteriana pueda dar lugar a diferentes bandas o picos debido a la heterogeneidad intraespecífica del gen *rss* (Nübel *et al.*, 1996) o a la heterogeneidad de copias diferentes del gen en un solo individuo (Schmalenberger *et al.*, 2001; Peixoto *et al.*, 2002). Tanto en un caso como en otro se puede subestimar o sobreestimar la diversidad microbiana, lo que es habitual en comunidades complejas. Este tipo de problemas se reducen cuando se acotan las poblaciones a estudiar en muestras de comunidades microbianas muy complejas. Los resultados del análisis de bandas o picos pueden utilizarse para calcular la riqueza específica, la biodiversidad o la homogeneidad de una muestra ambiental. Los índices de homogeneidad (*evenness*) son muy útiles para detectar cambios en la dominancia de determinados grupos microbianos en una muestra (Fromin *et al.*, 2002). El cálculo de cualquiera de esos índices permite, además, establecer los efectos de determinados factores (dieta, procesamiento de las muestras, defaunación, etc.) sobre las poblaciones microbianas (Kocherginskaya *et al.*, 2001; Yu y Morrison, 2004; Morgavi *et al.*, 2006)

Resolución del análisis

La DGGE permite el estudio del perfil de una comunidad microbiana pero solamente teniendo en cuenta las especies dominantes (Macnaughton y Stephen, 2001), puesto que no es posible detectar aquellas que constituyen menos de un 1% del total de la comunidad (Muyzer *et al.*, 1993). Por otra parte, ciertos autores consideran que la T-RFLP es más exacta cuando se emplea para el estudio de comunidades con riqueza específica baja o intermedia (Marsh, 1999; Dunbar *et al.*, 2000). Cuando la comunidad microbiana tiene más de 50 OTUs ninguna de las enzimas de restricción podría resolver más del 70% de los mismos (Engbretson y Moyer, 2003). No obstante, la T-RFLP permite mayor resolución que las técnicas electroforéticas en geles de poliacrilamida gracias al empleo de tecnologías de secuenciación (Marsh, 1999). Aunque ni DGGE ni T-RFLP son capaces de resolver el 100% de todos los filotipos presentes en una comunidad microbiana, como se ha

mencionado anteriormente, existen estrategias que permiten aumentar la resolución de los análisis (el uso de colas de diversa naturaleza para los cebadores, en el caso de la DGGE, y el empleo de mayor número de enzimas de restricción así como su optimización, en el caso de la T-RFLP).

Algunos autores han relacionado la intensidad de las bandas de la DGGE con la abundancia relativa de los filotipos de una muestra determinada (Murray *et al.*, 1996). Sin embargo, esto implicaría asumir que no se ha producido, por ejemplo, ningún sesgo a favor de determinadas especies, debido a la extracción de ADN o a su amplificación mediante PCR (Suzuki y Giovannoni, 1996; von Wintzingerode *et al.*, 1997) o que, en el caso de existir, los sesgos se hubieran producido del mismo modo en todas las muestras. La T-RFLP presenta el mismo problema, puesto que variaciones en la cantidad del ADN cargado en la electroforesis pueden dar lugar a variaciones en el área de los picos obtenidos (Osborn *et al.*, 2000). Es por ello que ambas técnicas, DGGE y T-RFLP, tienen un carácter semi-cuantitativo. Por otro lado, puesto que estos métodos solo permiten la detección de las especies dominantes en la comunidad, la relativización de la población de un determinado filotipo se haría con respecto al total de especies detectadas pero no con respecto al total real de especies de la comunidad (Fromin *et al.*, 2002; Blackwood *et al.*, 2007). Éste es un inconveniente importante puesto que las especies menos abundantes pueden contribuir, en gran medida, a la diversidad total de la comunidad (Blackwood *et al.*, 2007).

Identificación de especies

Tanto DGGE como T-RFLP permiten la identificación de una banda o pico si se ha cargado previamente un patrón. En el caso de la DGGE es posible la identificación de OTUs mediante clonación y secuenciación posterior. La técnica T-RFLP, al implicar una destrucción parcial de la muestra por digestión enzimática, no lo permitiría; sin embargo, existen determinadas herramientas informáticas que permiten identificar los microorganismos que componen una comunidad microbiana (APLAUS, PAT, TRUFFLER, T-REX). Con cualquiera de ellas es posible comparar los perfiles de FRTs de las muestras problema con combinaciones de

FRTs teóricos para una gran cantidad de especies, tanto cultivadas como no cultivadas. Para generar una base de datos de combinaciones de FRTs teóricos, se realiza una restricción *in silico*, con varias endonucleasas, de un conjunto de amplicones, generados también *in silico* a partir de una base de datos de secuencias y una pareja de cebadores universales para un grupo microbiano determinado. La restricción virtual puede realizarse mediante determinadas aplicaciones disponibles en internet. Esto supone una indudable ventaja con respecto a la DGGE en lo que se refiere a costo de la identificación de organismos.

A pesar de todo, ambas técnicas permiten el análisis simultáneo de multitud de muestras, siendo muy adecuadas para el estudio de los cambios en la estructura de las poblaciones microbianas, promovidos por alteraciones en el ambiente (Dunbar *et al.*, 2000; Kocherginskaya *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 2002).

2.4.2.4. Análisis multivariante de datos en ecología microbiana

El empleo de técnicas *fingerprinting* en estudios de ecología microbiana supone la obtención de un gran volumen de datos, cuyo análisis puede ser complejo y laborioso. El análisis multivariante, empleado desde hace bastante tiempo en estudios de ecología de macro-organismos, es también una herramienta valiosa para el análisis de los datos obtenidos en estudios de ecología microbiana. Este tipo de análisis permite la comparación estadística de los perfiles microbianos de distintas muestras y la identificación de grupos o patrones en las mismas (Hewson y Fuhrman, 2006), en base a sus perfiles microbianos, que pueden relacionarse con distintas variables (por ejemplo, el tipo de dieta, aditivo, etc.). La estadística multivariante incluye el análisis “cluster” y los métodos de ordenación. La selección del análisis adecuado para un estudio depende, en gran medida, del objetivo del mismo así como de la naturaleza de los datos obtenidos. Para visualizar determinados patrones o relaciones entre las muestras estudiadas se emplean métodos como el análisis de componentes principales (PCA: *Principal Component Analysis*) o el escalado multidimensional (MDS: *Multi Dimensional Scaling*), mientras que para establecer relaciones entre factores ambientales y perfiles microbianos de las muestras se usan el análisis de redundancia (RDA:

Redundancy Analysis) o el de correspondencias canónicas (CCA: *Canonical Correspondance Analysis*), los cuales permiten establecer diferencias estadísticas entre perfiles microbianos (Schütte *et al.*, 2008). Puesto que el CCA es un tipo de análisis que confiere mayor peso a las especies más raras de la comunidad que a las más abundantes, algunos autores desaconsejan su uso para el estudio de comunidades microbianas (Faith *et al.*, 1987; Culman *et al.*, 2008) y se decantan por otros métodos como el RDA o el PCA. Sin embargo, el inconveniente de estos métodos es que emplean las distancias euclídeas para el cálculo de las matrices de semejanza, distancias que no son adecuadas cuando existen numerosas especies con abundancias nulas, ya que conducen a estimaciones inadecuadas de la semejanza entre las comunidades microbianas de distintas muestras. Además, las distancias euclídeas asumen una respuesta lineal de los microorganismos ante las variables ambientales, lo que no siempre sucede en estudios de ecología microbiana (Legendre y Legendre, 1998; Grant *et al.*, 2003). Ciertos autores sugieren el empleo del escalado multidimensional amétrico ó NM-MDS (*Non-Metric Multidimensional Scaling*) cuando se asumen respuestas no lineares de los microorganismos a factores ambientales (Ramette, 2007). El NM-MDS es un método de análisis robusto, que se ha utilizado en estudios de comunidades microbianas muy complejas (Rees *et al.*, 2004; van der Gucht *et al.*, 2005; Culman *et al.*, 2008; Wakelin *et al.*, 2008). Es el método seleccionado para llevar a cabo el análisis de parte de los resultados de esta tesis.

El análisis cluster es preferible cuando se prevé obtener grupos o categorías de muestras definidos, puesto que las variaciones entre ellos son discontinuas. Es un tipo de análisis muy útil para resumir, en un solo gráfico, la información de varios gráficos de ordenación. No obstante, este análisis no permite validar o refutar una determinada hipótesis. La significación de las diferencias entre los grupos encontrados se puede establecer mediante un análisis de similitudes o ANOSIM, que en ningún caso es un análisis de la varianza. (Ramette, 2007). El método de agrupamiento seleccionado para llevar a cabo la construcción de un dendrograma depende, en gran medida, de los datos de los que se parte. Existen diversos métodos o algoritmos de agrupamiento en análisis cluster. Dos métodos ampliamente utilizados (Blackwood *et al.*, 2003) son el de Ward y el UPGMA

(*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*, también denominado *Average Linkage*). Ciertos autores recomiendan el empleo del método de Ward para la construcción de dendrogramas puesto que permite la identificación de grupos principales de muestras relacionadas (Blackwood *et al.*, 2003). Otros autores, sin embargo, postulan que este método es menos preciso en comparación con otros como el UPGMA ya que el primero puede llevar a la obtención de grupos artificiales, por lo que es más adecuado solo si realmente está clara la presencia de grupos funcionales claramente distinguibles (Grant *et al.*, 2003). El UPGMA (Sokal y Michener, 1958; Murtagh, 1984) es uno de los algoritmos más empleados en estudios de ecosistemas gastrointestinales (Possemiers *et al.*, 2004; Vanhoutte *et al.*, 2005, 2006; Morgavi *et al.*, 2006) y fue el que se seleccionó para llevar a cabo la construcción de los dendrogramas que aparecen en esta tesis.

La selección de los coeficientes empleados para calcular la matriz de distancias o similitudes depende de diversos factores como el número y resolución de bandas o picos así y la homogeneidad de la intensidad o área de los mismos, respectivamente. El índice de Sørensen es más sensible que otros existentes, cuando se aplica a conjuntos de datos muy heterogéneos (Culman *et al.*, 2008) y confiere menor importancia relativa a aquellas muestras que se alejan bastante del resto (McCune *et al.*, 2002). A diferencia de las distancias euclídeas, ni el índice de Bray-Curtis ni el de Sørensen tienen en cuenta, como indicio de similitud entre 2 muestras, aquellos picos no presentes en ambas (Clarke *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 2007). Los índices de Bray-Curtis y de Sørensen se han empleado para la construcción de los dendrogramas que se incluyen en esta Memoria.

2.4.2.5. Cuantificación de grupos microbianos: PCR en tiempo real

Existen diversas técnicas moleculares que permiten cuantificar las poblaciones microbianas, destacando la PCR competitiva, la FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) y la RT-qPCR (PCR en tiempo real o PCR cuantitativa). La técnica más empleada en la actualidad es la RT-qPCR.

La técnica de PCR en tiempo real se basa en la detección de la fluorescencia emitida por las cadenas de ADN que se van formando en el proceso de

amplificación *in vitro*. Para ello se utiliza una molécula simple (fluorocromo) o compleja (sonda de ADN), capaz de emitir fluorescencia solo tras unirse al ADN de cadena doble y, un equipo detector de la misma, que monitoriza ciclo a ciclo de amplificación el aumento exponencial en el número de cadenas de ADN. En los ensayos de este trabajo de Tesis, la molécula señalizadora empleada fue SYBR Green I. La RT-qPCR consta de las mismas etapas que tienen lugar en una PCR convencional pero, además, en cada ciclo de amplificación, tras la fase de elongación de las cadenas, se programa un paso extra de detección de la fluorescencia emitida por la molécula que se une a las cadenas de ADN. El *software* del aparato detector genera una gráfica que relaciona el ciclo de amplificación con la fluorescencia emitida por SYBR Green I (**Figura 2.2**).

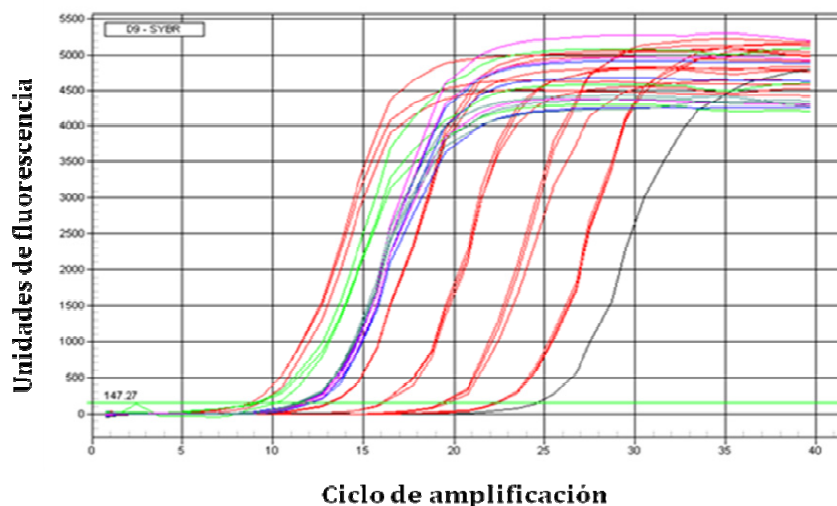


Figura 2.2. Curvas de amplificación, generadas mediante RT-qPCR, de varias muestras de concentración conocida (en rojo) y de varias muestras problema (en verde, azul y rosa).

El primer tramo de la gráfica responde a un crecimiento exponencial en el número de cadenas de ADN, pero a medida que se van agotando los sustratos y que las polimerasas dejan de estar disponibles para replicar nuevas cadenas, la amplificación alcanza una fase de meseta similar a la observada para las cinéticas enzimáticas de Michaelis-Menten. Es la fase exponencial de amplificación la que permite el cálculo del ADN que existe en la muestra analizada en cada momento. El cálculo de las copias de una secuencia determinada se hace relacionando la fluorescencia emitida por las dobles cadenas de ADN con una variable denominada

“ciclo umbral” (C_T). El C_T es el ciclo de amplificación en el que el nivel de fluorescencia emitida está claramente por encima del ruido electrónico generado por la autofluorescencia del fluoróforo sin unir al ADN, es decir, el ciclo que indica que se ha alcanzado un umbral de fluorescencia. El C_T es un parámetro que depende de diversos factores, siendo el principal la cantidad de ADN de la muestra que se ha cargado en el sistema. El valor de C_T también puede verse afectado por la especie bacteriana estudiada (Firkins y Zu, 2006), por la presencia de inhibidores en la muestra, que ralenticen el proceso de amplificación, o por la formación de dímeros de cebadores durante el proceso. Existe una relación lineal inversa entre el C_T y la cantidad de ADN molde presente al inicio de la reacción. En esta relación reside el fundamento de la técnica. La cuantificación se puede realizar de forma absoluta, si se emplean diluciones seriadas de ADN estándar, de concentración conocida, para construir una recta patrón a partir de la cual interpolar la cantidad de ADN presente en las muestras problema (**Figura 2.3**). La expresión matemática para el cálculo de la cantidad de ADN inicial en una muestra sería:

$$\text{Log}[ADN] = -A \times C_T + B$$

$\text{Log}[ADN]$ puede referirse tanto a la concentración de ADN como al número de copias del fragmento diana a amplificar.

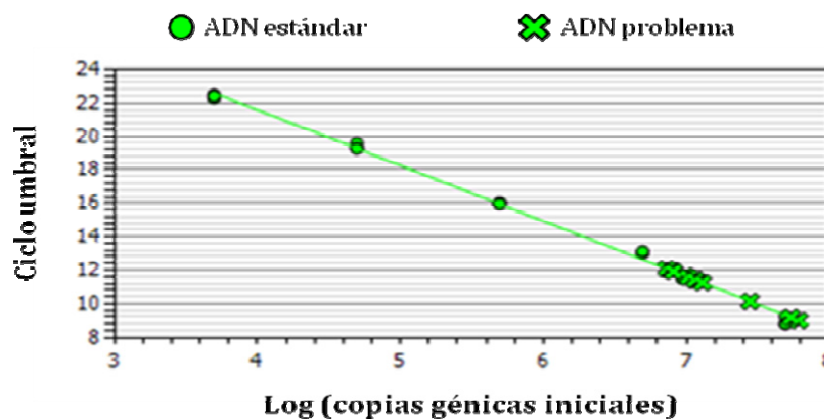


Figura 2.3. Recta patrón construida a partir de diluciones seriadas de una muestra de ADN molde de concentración conocida. A partir de esta recta se interpola la cantidad de ADN presente inicialmente en las muestras problema.

Puede recurrirse también a un método alternativo de cuantificación sin recta patrón, relativizando los valores de C_T encontrados para la secuencia de interés con respecto a los valores de C_T encontrados para un gen de expresión constitutiva. Para este tipo de cuantificación, existen diversas modalidades de cálculo (Pfaffl, 2001; Denman y McSweeney, 2005). En el caso de muestras del contenido ruminal, que presentan una alta concentración de materia orgánica (material vegetal y otros restos de alimentos), la obtención de una muestra de ADN con una alta pureza así como la cuantificación absoluta de las poblaciones microbianas pueden resultar complicadas, por lo que es de gran utilidad la relativización de las abundancias microbianas (Stevenson y Weimer, 2007).

2.5. EL SECTOR CAPRINO

2.5.1. Importancia socioeconómica, censos y sistemas de producción

El caprino representa una alta proporción del total de animales de producción en el mundo, situándose en tercer lugar tras el vacuno y el ovino entre los rumiantes, y en cuarto lugar tras el porcino. Más del 90% del ganado caprino se encuentra en países con bajos ingresos (países no desarrollados y en vías de desarrollo), especialmente en zonas desfavorecidas de Asia y África, y otros países de la Cuenca del Mediterráneo. En estas zonas, donde hay una gran escasez de pastos, la producción animal está limitada pero el caprino tiene un importante papel socioeconómico y ambiental, contribuyendo al mantenimiento de la población rural (Morand-Fehr *et al.*, 2004). En Europa, el ganado caprino representa casi el 2% del total mundial. En el contexto europeo, Grecia ocupa el primer lugar en cuanto a número de cabezas de caprino y, España es el segundo (2,9 millones de animales). Si se considera la producción de leche, Francia ocupa el primer lugar seguida de Grecia y España, por ese orden (FAOSTAT, 2009). En España, las regiones con mayor número de cabezas de caprino son Andalucía (casi un 36% del total), Castilla La Mancha, Canarias y Extremadura, que concentran un 72% del total de cabras, seguidas por Murcia y Castilla y León (MARM, 2009). El censo de caprino en España se ha mantenido durante los últimos 3 años ya que el descenso

experimentado en Andalucía y Canarias se ha compensado con el considerable incremento que se ha producido en Castilla La Mancha.

La producción de caprino, tras un largo periodo de alti-bajos marcados, iniciado en el siglo XIX, repuntó a partir de finales de los años 70 como consecuencia de una nueva mentalidad contraria a las técnicas intensivas en agricultura y la vuelta a los métodos más tradicionales (Boyazoglu *et al.*, 2005). Actualmente existe una tendencia al alza en el número de cabezas de caprino, especialmente en los países más pobres, lo que podría ayudar a paliar las necesidades de alimentos, asociadas a la explosión demográfica de muchos de esos países (Morand-Fehr *et al.*, 2004; Boyazoglu *et al.*, 2005). No obstante, en la UE, desde mediados de los años 90 se ha observado un descenso, aunque en algunos países como Francia y España la cabaña de cabras ha aumentado (un 3,4 y un 8,8%, respectivamente). En España, la población de caprino y la producción de leche en los últimos 10 años se han mantenido relativamente constantes, aunque en el año 2008 se registró un aumento del 121,3% en la producción de leche (FAOSTAT, 2009).

Los sistemas de explotación de caprino españoles son heterogéneos pero tienen en común un marcado carácter familiar, una deficiente tecnificación y gestión económica y una tendencia hacia la intensificación. La mayor parte de las explotaciones tienen un carácter semi-intensivo o semi-extensivo, con una alimentación basada en pastos y suplementada con concentrados, en los periodos de mayor producción de leche y de escasez de pastos (Mena-Guerrero *et al.*, 2005). Los sistemas extensivos son escasos y se dedican fundamentalmente a la explotación de razas cárnicas. El aumento en los precios de la leche, a mediados de los años 90, marcó el inicio de una producción caprina más intensiva (Castel *et al.*, 2010). Actualmente el sector caprino en España está orientado, esencialmente, a la producción de leche. En 2009, el censo de cabras productoras de leche era de 1,65 millones de cabezas (FAOSTAT, 2009). La producción de leche en nuestro país, en ese año, se situó en segundo lugar tras la de leche de vaca (FAOSTAT, 2009). La mayor parte de la leche obtenida se dedica a la producción de queso (Castel *et al.*, 2010).

2.5.2. Fluctuación en el precio de los cereales e impacto en la producción caprina. Fuentes de nutrientes alternativas

Los forrajes constituyen el alimento básico para rumiantes pero diversas causas como una baja disponibilidad y/o calidad de los pastos, el aumento de las necesidades alimenticias de los animales o la tendencia a la intensificación de los sistemas productivos determinan un incremento en el uso de concentrados. Ello implica un incremento en el coste de la alimentación (Ben Salem y Nefzaoui, 2003). Los concentrados están constituidos mayoritariamente por cereales, cuyo cultivo es uno de los más importantes en el mundo, tanto por la superficie que ocupan como por su producción. La cebada es uno de los cereales más empleados para la alimentación de los animales, sobre todo en Europa, norte de EEUU y Canadá. La superficie dedicada al cultivo de la cebada ocupa el 4º lugar en relación a la total destinada al cultivo de cereales; la producción de cebada en la Unión Europea ocupa el segundo lugar tras la de trigo (FAOSTAT, 2009).

En la última década, el precio de los cereales, en general, y el de la cebada, en particular, ha experimentado un notable incremento. Según datos del Boletín Mensual de Estadística del MARM, actualizados a febrero del 2011, el precio de la cebada para pienso en España se situó en 231 euros por tonelada, lo que supone un incremento del 2,32% respecto al mes anterior y un 72,64% con respecto a febrero del año 2010. Desde mediados del año 2010, la tendencia para este cereal ha sido al alza (**Figura 2.4**). El aumento del precio de la cebada en un año, además, ha sido superior al del maíz grano y al del trigo blando. En 2007, se vivió una situación similar cuando los cereales, que llevaban treinta años manteniendo los precios en la cuota más baja, subieron hasta alcanzar récords históricos. Esta subida de precios de los cereales y de otros alimentos generó una crisis alimentaria a nivel mundial en 2008. Diversos factores pueden estar relacionados en este aumento de precios: la fuerte interdependencia de la agricultura y los mercados no agrícolas (energía, industria, finanzas, etc.), derivada del fenómeno de globalización; el desacople entre el crecimiento de la población, de patrón geométrico, y la producción de alimentos, de progresión aritmética; un fuerte incremento de la demanda en algunos países; las malas cosechas de 2006 y 2007 en países productores importantes; el uso de parte de la producción para obtener

biocombustibles; y la especulación financiera (Tomás, 2008). Los cereales se dedican actualmente a la alimentación humana, a la producción de bebidas alcohólicas y no alcohólicas y a la producción de biocombustibles. Por otra parte, las sequías e inundaciones recientes, acaecidas en países productores (Rusia y Australia), así como la crisis política en ciertos países del Magreb y Oriente Próximo, con sus repercusiones en el suministro de petróleo y el incremento de la demanda en países emergentes como China podrían determinar un nuevo incremento de los precios de los cereales.

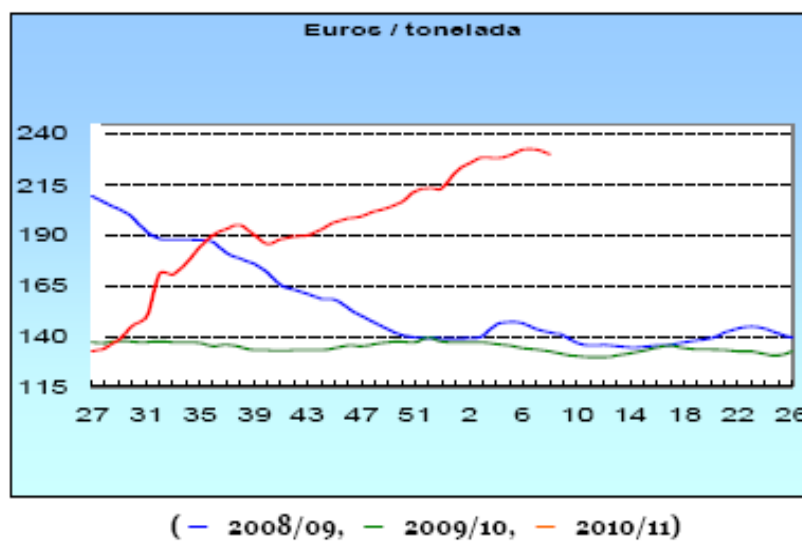


Figura 2.4. Evolución de los precios de la cebada pienso, por semanas, desde mediados del año 2008 hasta inicios del año 2011 (MARM, 2011).

Puesto que el panorama de precios de los cereales en los próximos años no es alentador, la búsqueda de fuentes de nutrientes para el ganado, alternativas a los cereales, podría disminuir la dependencia de los mismos en la producción animal. Estimular el aprovechamiento de pastos naturales o sustituir el concentrado por forrajes de buena calidad u hojas de leguminosas podría contribuir a reducir el empleo de concentrados y, por tanto, de cereales, en la alimentación del ganado caprino (Richards *et al.*, 1994; Morales *et al.*, 2000). El uso de alimentos no convencionales como los residuos y subproductos agroindustriales, que han adquirido una gran importancia en la alimentación de rumiantes, en especial en regiones cálidas y templadas del planeta, puede representar otra vía para reducir el uso de concentrados si no se compromete la productividad o calidad de los

productos animales (Vasta *et al.*, 2008). Muchos de los estudios realizados en este sentido se han centrado en el ganado caprino (Belewu y Ademilola, 2002; Bueno *et al.*, 2002; Ben Salem *et al.*, 2003; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2004a, b; Molina-Alcaide *et al.*, 2008, 2010). Las características fisiológicas del digestivo de esta especie de rumiantes la hacen especialmente adecuada para el aprovechamiento de alimentos de baja calidad nutritiva (Molina-Alcaide *et al.*, 1997).

España es el país de la Unión Europea con más superficie (70.743 Ha) dedicada al cultivo bajo cubierta o de “invernadero” (MARM, 2009) principalmente en Andalucía (más del 75% de la superficie nacional de invernaderos). Este tipo de cultivo genera una abundante cantidad de residuos de distinta índole: hojas, ramas y frutos diversos, constituyendo estos una importante fuente potencial de nutrientes para el ganado. El tomate y el pepino son dos de los productos hortofrutícolas más abundantes del sector primario en España. La producción total en 2008 fue de 4,05 millones y 67.0000 Tm de tomate y pepino, respectivamente, siendo el 1º y 5º frutos de hortalizas más abundantes en ese año (MARM, 2009). Según estimaciones del año 2009, España se situaría en tercer lugar en cuanto a la producción de tomate en la Cuenca del Mediterráneo, tras Egipto e Italia, generando un 27% de la producción total de este fruto de toda la Unión Europea. La producción relativa de pepino en España, con respecto a la Unión Europea, es más difícil de establecer puesto que las estadísticas existentes son de producción conjunta de pepinos y pepinillos (FAOSTAT, 2009). En 2008, Andalucía fue la región con mayor producción de tomate, seguida muy de cerca por Extremadura, alcanzando la producción en ambas comunidades el 36% del total nacional. La estacionalidad y el sistema de cultivo varían según comunidades: en Andalucía se produce tomate durante todo el año, mientras que en Extremadura y Murcia la recolección del mismo se da entre los meses de junio a diciembre y de octubre a mayo, respectivamente. La bibliografía disponible indica que, si bien la pulpa de tomate, que se genera en la elaboración de salsas o conservas, se ha estudiado en cuanto a su potencial como fuente de nutrientes para rumiantes (Fondevila *et al.*, 1994; Denek y Can, 2006), solo se ha encontrado un trabajo que estudia la calidad nutritiva y la digestibilidad del fruto del tomate (Ventura *et al.*, 2009) y ninguno en relación al fruto del pepino. Es, por tanto, de gran interés explorar el potencial de

los destríos de frutos de tomate y pepino como fuentes de nutrientes para rumiantes.

El empleo de residuos y excedentes de producción de cultivos de invernadero en la alimentación de rumiantes puede ayudar a reducir los costes de producción y paliar el problema de la gestión de estos residuos. De cara a su empleo como alimentos para rumiantes, en Andalucía, los frutos de tomate y pepino de invernaderos presentan la doble ventaja de estar disponibles durante la mayor parte del año y ser abundantes, lo que obliga, en múltiples ocasiones, al descarte de grandes cantidades de estos frutos para aumentar los precios en origen. No obstante, las marcadas oscilaciones del valor de los productos hortícolas en origen pueden determinar una gran variabilidad en el volumen de destríos a lo largo del año (Figura 2.5).

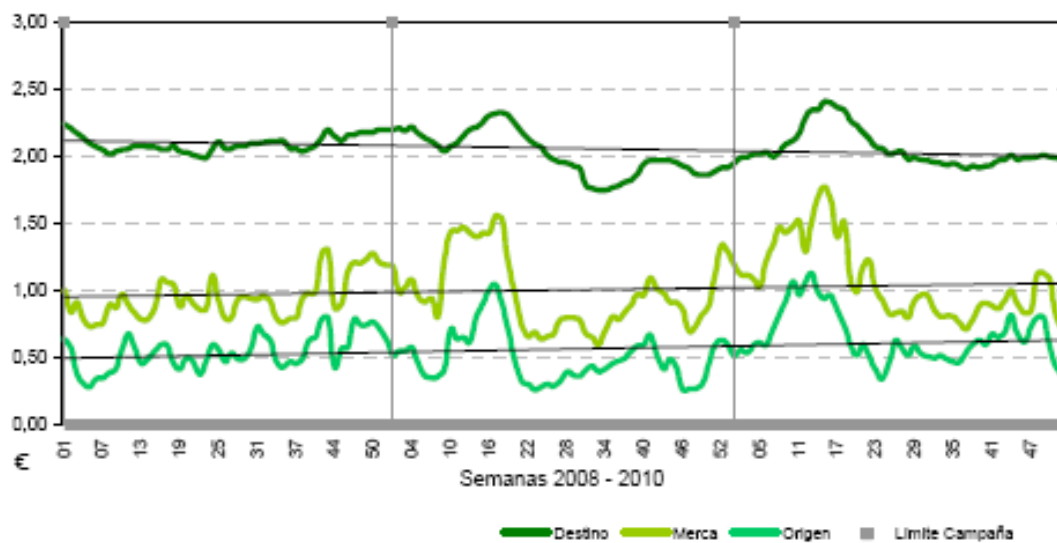


Figura 2.5. Fluctuaciones en el precio del tomate redondo liso en el periodo 2008-2010. Precios semanales en 3 niveles (MARM, 2010).

Capítulo 3

Material y métodos

La presente memoria de tesis doctoral recoge los resultados obtenidos en 5 experimentos diferentes.

El **experimento 1** se llevó a cabo con el fin de estudiar la variabilidad individual de las poblaciones bacterianas de animales de la especie caprina, pertenecientes a un mismo rebaño, y la persistencia de estas diferencias, en caso de existir, tras intercambiar contenido ruminal de unos animales a otros. Los resultados de este experimento aparecen en la **publicación 1**.

El **experimento 2** se llevó a cabo con el objeto de evaluar la evolución temporal de las concentraciones de bacterias, arqueas metanogénicas, hongos y bacterias celulolíticas durante el periodo de adaptación a las condiciones experimentales en fermentadores de flujo continuo simple, alimentados con dietas constituidas por heno de alfalfa y concentrado en dos proporciones diferentes: 70:30 (dieta LC) y 30:70 (dieta HC). Los resultados de este experimento aparecen en la **publicación 2**.

Los **experimentos 3, 4 y 5** se llevaron a cabo para: a) estudiar comparativamente la microbiota que se desarrolla en distintos sistemas *in vitro* y el grado de similitud con la microbiota de la fracción líquida del contenido ruminal y; b) estudiar el efecto de incluir en la dieta del rumiante destríos de tomate y pepino, procedentes de invernaderos, como sustitutos de la cebada sobre la fermentación ruminal, el crecimiento microbiano y la biomasa y diversidad de algunos grupos microbianos.

Los resultados de los experimentos 3, 4 y 5, concernientes a las poblaciones microbianas se recogen en la **publicación 3**. Los relativos a los parámetros de fermentación se reflejan en la **publicación 4**.

3.1. DIETAS

En el **experimento 1** la dieta suministrada a los animales era heno de alfalfa.

En el **experimento 2** se emplearon dos dietas a base de heno de alfalfa y concentrado en diferentes proporciones: 70:30 (dieta LC) y 30:70 (dieta HC). La

composición química de los ingredientes mencionados se muestra en la **Tabla 4.2.1** de la **publicación 2**.

En el **experimento 3** se usaron materias primas como grano de cebada, paja de trigo, heno de alfalfa, torta de girasol, harina de salvado de trigo, tomate y pepino liofilizados y molidos (1 mm), ingredientes de las dietas estudiadas en los experimentos 4 y 5. La composición química se presenta en las **Tablas 4.3.1** y **4.4.2** de las **publicaciones 3** y **4**, respectivamente.

En el **experimento 4** se empleó una dieta control (CO) a base de paja de trigo (30%), cebada (25%), heno de alfalfa (22%), torta de girasol (15%) y harina de salvado de trigo (5%). También se utilizaron 15 dietas experimentales en las que la cebada se reemplazó progresivamente (20%, 40%, 60%, 80% y 100%) por cantidades crecientes de destríos de tomate (dietas T1, T2, T3, T4 y T5), pepino (dietas C1, C2, C3, C4 y C5) o una mezcla (1:1) de ambos tipos de destríos (dietas TC1, TC2, TC3, TC4 y TC5). Todas las dietas incluían un 1% de mezcla minero-vitamínica compuesta (por kg) de 277 g NaCl, 270 g de cenizas de alpeorajo, 250 g $(\text{PO}_4)_2\text{H}_4\text{Ca}$, 200 g MgSO_4 , 8,5 mg CoO, 4 mg Se, 2,5 mg I, 83.500 y 16.700 IU de vitaminas A y D, respectivamente.

En cada serie de experimentos se incubaron también heno de alfalfa, como estándar (HA) y un blanco (BL). La composición de las dietas aparece en la **Tabla 4.4.1** de la **publicación 4**. En el **experimento 5** se estudiaron comparativamente la dieta control y aquellas que incluían los niveles más elevados de destríos (dietas T5, C5 y TC5, respectivamente para tomate, pepino y mezcla tomate-pepino).

3.2. ANIMALES

Se utilizaron cabras de raza granadina con un peso vivo medio de $47 \pm 2,2$ kg, dotadas de cánula ruminal permanente y alojadas en jaulas individuales. Los animales recibieron un tratamiento antiparasitario (Ivomec 0,5 ml/kg de peso vivo, Lab MSD AGVET), vía intramuscular, un mes antes de la implantación de las cánulas ruminales. Los animales se adaptaron a las condiciones de confinamiento en las jaulas para evitar trastornos de comportamiento, en general, y de la ingestión, en particular. El manejo de los animales y los procedimientos

experimentales se llevaron a cabo por personal entrenado en este tipo de prácticas, siguiendo la normativa recogida en el Real Decreto 1201/2005 relativo a la protección de los animales destinados a fines experimentales, en línea con la Convención Europea para la Protección de Animales Vertebrados empleados con fines experimentales y científicos (Directiva Europea 86/609).

La extracción del contenido ruminal se realizó a través de la cánula y 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. De cada uno de los animales se toma una cantidad similar de contenido ruminal, que se recoge en un termo precalentado a 38°C. El contenido ruminal se filtra a través de 4 capas de gasa, en un frasco, con infusión continua de CO₂. En función del objetivo del experimento correspondiente, el contenido ruminal bien se transfirió a otro animal (**experimento 1**) o bien se utilizó para preparar el inóculo para realizar incubaciones en las jarras de digestibilidad del sistema Daisy^{II} de ANKOM Technology (**experimento 3**), en frascos Wheaton (**experimento 4**) o en fermentadores de flujo continuo (**experimentos 2 y 5**). En cualquier caso, desde que se extrae el líquido ruminal de los animales hasta que se utiliza transcurren, como máximo, 30 minutos.

3.3. SISTEMAS *IN VITRO*

3.3.1. Incubador para la determinación de la digestibilidad *in vitro*

El sistema Daisy^{II} (ANKOM Technology) es un incubador con control de temperatura que contiene 4 frascos de vidrio, alojados en soportes que permiten la rotación continua de los mismos (**Figura 3.1**). Cada uno de los frascos de incubación tiene un volumen de 4 litros y cierre hermético, con válvula de escape para la liberación de los gases de fermentación. En cada frasco se colocan, como máximo, 25 sacos en cada uno de los cuales se introduce una muestra del material cuya digestibilidad se quiere determinar. La digestibilidad de un determinado nutriente se expresa como la desaparición de dicho nutriente durante el tiempo de incubación.



Figura 3.1. Sistema de incubación Daisy^{II} (ANKOM Technology).

3.3.2. Cultivos no renovados de microorganismos ruminales (CNRMR)

Se utilizan frascos Wheaton de unos 120 ml de capacidad que se sellan con tapones de goma y arandelas de aluminio a presión. Los frascos se incuban en un baño de agua a $39^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para posibilitar un mejor control de la temperatura y evitar una pérdida excesiva de agua por evaporación, los frascos se cubren con papel de aluminio y con trozos de poliespán.

El medio de cultivo en el que se incuban las muestras consiste en una mezcla de filtrado del contenido del rumen y una disolución tamponadora (Goering y van Soest, 1970) en la proporción 1:4 (v:v). La composición de esa disolución aparece en la **Tabla 3.1** de este capítulo. Previamente a su incorporación al contenido ruminal filtrado, la disolución tampón se gasea con CO_2 , o con otro gas capaz de desplazar el O_2 , durante el tiempo suficiente para que tenga lugar una adecuada reducción de la misma, lo cual se verifica mediante el viraje de color de morado a rosa de la resazurina disuelta en la mezcla. Las muestras problema se incuban en los frascos durante un periodo de 72 horas, realizándose mediciones de presión y volumen del gas de fermentación producido a intervalos de dos horas durante las primeras 12 horas y a las 24, 48 y 72 horas tras la inoculación de los frascos (**Figura 3.2**).

Tabla 3.1. Composición de la disolución tampón (medio de Goering y van Soest, 1970 sin tripticasa) empleada para el experimento realizado con CNRMR.

	g/L
Na₂HPO₄	5,7
KH₂PO₄	6,2
MgSO₄·7H₂O	0,6
CaCl₂·2H₂O	13,2
MnCl₂·4H₂O	10,0
CoCl₂·6H₂O	1,0
FeCl₃·6H₂O	8,0
NaHCO₃	37,0
(NH₄)HCO₃	2,0
Resazurina	1,0
Cisteína-HCl	6,25
NaOH (1N)	40,0
Na₂S	6,25



Figura 3.2. Medida de la presión y del volumen de gas en los frascos Wheaton.

3.3.3. Fermentadores de flujo continuo simple (FFCS)

Se emplea una batería de FFCS (**Figura 3.3**), basados en el modelo desarrollado por Miettinen y Settälä (1989), con numerosas modificaciones realizadas por el grupo “Producción de Pequeños Rumiantes” de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC). Cada uno de los frascos de fermentación tiene una capacidad de 1 litro y

está provisto de varias aberturas: para el suministro de la dieta, para la infusión de CO₂, para la infusión de saliva artificial y para introducir una sonda de pH-metro. Cada frasco de fermentación presenta también un orificio de salida del efluente (mezcla de partículas de alimento no digerido, microorganismos y líquido), que se recoge en un matraz Erlenmeyer, mantenido en un baño a 3°C para detener la actividad microbiana.



Figura 3.3. Frascos de fermentación de los FFCS.

Durante el experimento, la dieta y el inóculo ruminal se mezclan de forma continua mediante una varilla de acero, acoplada a un motor giratorio, en cuyo extremo inferior existe una hélice tripala. El CO₂ se infunde también de forma continua para mantener la anaerobiosis en el interior de los frascos de fermentación y, el pH se mantiene dentro de un margen de valores considerado como fisiológico, mediante la infusión de saliva artificial con un flujo de 40 ml/h (McDougall, 1948). A cada frasco de fermentación se le suministra diariamente una cantidad fija de dieta, repartida en 2 tomas (9:00 y 16:00 horas). El volumen y el peso de los efluentes producidos se cuantifican diariamente y los valores de pH en el frasco de fermentación se registran también diariamente, antes del suministro de alimento. Cada serie de incubación incluye una fase de adaptación a la dieta durante la cual solo se anotan el peso y el volumen del efluente producido diariamente, y una fase de muestreo durante la que se toman alícuotas del contenido de los fermentadores y de sus efluentes para llevar a cabo las distintas determinaciones analíticas.

3.4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.4.1. Experimento 1: Estudio de la variabilidad individual de la comunidad bacteriana ruminal de cabras y de la persistencia de esta variabilidad tras intercambiar contenido ruminal entre animales

Los animales se alimentaron con heno de alfalfa, suministrado en cantidad suficiente para atender a las necesidades de mantenimiento energético de caprino (Prieto *et al.*, 1990), dos veces al día (9:00 y 16:00h). La adaptación de los animales a la dieta se prolongó durante 30 días. Los días 31 y 45 se recogieron muestras (40 ml) de contenido del rumen a las 0, 2 y 4 horas tras el suministro de alimento por la mañana. Las muestras se pesaron e inmediatamente se congelaron a -20°C. Estas muestras, previa liofilización, se emplearon para la extracción de ADN y el posterior estudio de la estructura de las poblaciones bacterianas ruminales de cada animal. Para evaluar la consistencia de las diferencias observadas entre esos animales se llevaron a cabo otras 2 fases del experimento, en las cuales parte del contenido ruminal de los animales se intercambió de unos a otros. Cada una de estas fases duraba 45 días. Al principio de cada fase se procedía a intercambiar 1,5 kg de contenido ruminal de un animal a otro: del animal 1 al 2, del animal 2 al 3 y del animal 3 al 1 en la fase 1 y del animal 2 al 1, del 1 al 3 y del 3 al 2 en la fase 2. Los días 31 y 45 de cada fase, se tomaron muestras de contenido ruminal, 2 horas tras el suministro matinal del alimento, se pesaron y se congelaron a -20°C.

3.4.2. Experimento 2: Estudio de la evolución de las concentraciones de bacterias, arqueas, hongos y bacterias celulolíticas, y de la diversidad y estructura de las poblaciones bacterianas durante la adaptación a las condiciones experimentales *in vitro*, en fermentadores de flujo continuo simple inoculados con líquido ruminal de cabras

Se utilizaron, como donadores del inóculo ruminal, 4 cabras de raza granadina dotadas de cánula ruminal y alojadas individualmente. Siguiendo un diseño experimental cruzado 2 x 2 (2 dietas y 2 grupos de animales o fermentadores) se llevaron a cabo dos periodos experimentales distintos. En cada uno de los periodos, 2 animales se alimentaban al azar con cada una de las 2 dietas

experimentales: heno de alfalfa:concentrado con dos proporciones diferentes, 70:30 (dieta LC) y 30:70 (dieta HC) suministradas en dos tomas (9:00 y 14:00 h) en cantidad suficiente para atender los requerimientos energéticos de mantenimiento de los animales (Prieto *et al.*, 1990). Tras 10 días de adaptación a la dieta correspondiente, se tomaron muestras (40 ml) del contenido ruminal de cada animal en frascos estériles, y se conservaron a -20°C para su posterior liofilización. Ese mismo día también se obtuvo contenido ruminal de cada animal y se filtró a través de 4 capas de gasa para inocular los fermentadores de flujo continuo simple tal como se detalla en el **apartado 3.2**. En cada una de las incubaciones, cada fermentador era inoculado con líquido ruminal filtrado del animal donador que recibía la misma dieta que se suministraba a ese fermentador. Las incubaciones tuvieron una duración de 7 días. Los días 1 y 7 de cada incubación se tomaron muestras (2 ml) del contenido de los fermentadores en tubos estériles, que se conservaron a -20°C.

3.4.3. Experimento 3: Estudio de la microbiota desarrollada en los frascos de incubación del sistema Daisy^{II} durante la determinación de la digestibilidad de una serie de materias primas

La técnica empleada es la descrita por Tilley y Terry (1963), realizándose las determinaciones con muestras desecadas y molidas en molino de cuchillas (Retsch, Mod. SM-1), con tamiz de 1 mm de luz de malla. Se obtuvieron muestras de contenido ruminal de 3 cabras canuladas, que se mezclaron y filtraron a través de 4 capas de gasa tal como se detalla en el **apartado 3.2** de esta Memoria. El líquido filtrado resultante se mezcló con una disolución de saliva artificial (Mcdougall, 1948) en una proporción 1:4 (v:v) para obtener el inóculo. La mezcla saturada con CO₂, se introduce en las jarras de incubación y, a continuación, se introducen los sacos tarados de poliéster, libres de nitrógeno y cenizas (#F57, ANKOM Technology), con las muestras molidas (0,5 g) y sellados térmicamente. Una alícuota de 40 ml del inóculo se mantuvo a -20°C en un frasco estéril. Cada uno de los frascos se purgaba con CO₂ antes de cerrarse. La temperatura del incubador se mantenía constante a 39 ± 0,5°C. Tras 48 h de incubación se abrían los frascos, se tomaba una muestra de 40 ml del medio de incubación de cada uno y se congelaba

a -20°C. Los sacos se extraían de los frascos de fermentación, se lavaban con agua fría del grifo, eliminándose el exceso de agua por presión sobre los mismos y se guardaban a -20°C para detener la actividad microbiana. Las muestras congeladas, tanto del inóculo antes del inicio de la incubación como del contenido de cada uno de los frascos de fermentación tras 48 horas de incubación, se liofilizaron. La muestra liofilizada se empleó para extraer el ADN total, punto de partida para posteriores determinaciones moleculares reseñadas más adelante. El resto del procedimiento de determinación de digestibilidad se llevó a cabo de la forma habitual: los sacos se vuelven a introducir en las jarras de vidrio, rellenas con 2 litros de una solución de pepsina (Sigma P-7012, Sigma-Aldrich Corp.) en medio ácido (2g de pepsina 1:10.000 por litro de HCl 0,1N), manteniéndose otras 48 h en agitación constante y a $39 \pm 0,5^\circ\text{C}$ en el incubador descrito anteriormente. En cada una de las series de incubación se introducen tres muestras patrón cuya digestibilidad *in vivo* se había determinado previamente en nuestro laboratorio: dos henos de alfalfa de diferente calidad y orujo de aceituna procedente del proceso de extracción del aceite por centrifugación en tres fases. En cada una de las series de incubación se utilizan también dos blancos.

Tras las dos etapas sucesivas de incubación descritas, los sacos que contienen los residuos se desecan en estufa de ventilación forzada a $103 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas, pesándose a continuación. Los coeficientes de digestibilidad de materia seca (MS) y materia orgánica (MO) se calculan como porcentajes del correspondiente nutriente desaparecido tras las dos fases de incubación.

3.4.4. Experimento 4: Estudio del efecto de la sustitución de cebada por destríos de invernaderos (tomate y pepino) sobre la fermentación ruminal en cultivos no renovados de microorganismos ruminales

Se llevaron a cabo 3 series de incubaciones en los frascos Wheaton mencionados en el **apartado 3.3.2**. El inóculo ruminal se obtuvo de la forma ya descrita en apartados anteriores, a partir de animales alimentados con una dieta a base de heno de alfalfa, y se mezcló con la solución tampón mencionada anteriormente (**Tabla 3.1**). La mezcla se distribuyó, mediante un dispensador, en los frascos

Wheaton (50 ml/frasco), los cuales contenían 0,5 g de MS de cada una de las dietas experimentales, manteniéndose la infusión de CO₂ tanto en el recipiente que contenía el inóculo como en los frascos Wheaton. A las 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 y 72 horas de iniciarse la incubación se procedió a la medida de la presión y del volumen de gas en cada uno de los frascos utilizándose un manómetro Wide Range Pressure Meter (Sper Scientific Ltd.) y una jeringa de vidrio calibrada, respectivamente. En cada una de las series de incubación la mitad de los frascos se abrieron tras 24 de incubación y la otra mitad, a las 72 horas. Se midió el pH del contenido del frasco, se detuvo la fermentación introduciendo los frascos en hielo y se recogieron alícuotas (1 ml), para la determinación del contenido en ácidos grasos volátiles (AGVs) y amonio así como para la determinación del contenido en nitrógeno total (5 ml). El resto del contenido de los frascos se pesó, se congeló a -20°C y se liofilizó. La muestra liofilizada se utilizó para determinar su contenido en MS, MO, fibra neutro detergente (FND) y bases púricas (BP). Para la extracción del ADN total se utilizó una alícuota de la muestra liofilizada. El ADN extraído se utilizó para la cuantificación de diversos grupos microbianos y el estudio de la diversidad y la estructura de las poblaciones bacterianas ruminales.

3.4.5. Experimento 5: Estudio del efecto de la sustitución de cebada por destríos de invernaderos (tomate y pepino) sobre la fermentación ruminal y la microbiota en fermentadores de flujo continuo simple

Se llevaron a cabo 2 series de incubación utilizando la batería de 8 fermentadores de flujo continuo simple descritos en el **apartado 3.3.3**. El inóculo ruminal se obtuvo, como ya se ha descrito en distintos apartados, de animales alimentados con heno de alfalfa. Dos veces al día, se suministraban aproximadamente 30 g de MS de las dietas experimentales a cada uno de los fermentadores y se controlaba el pH. Cada serie de incubación incluía un periodo de adaptación de 4 días durante los cuales se registraba el peso y el volumen de los efluentes de cada fermentador. El último día del periodo de adaptación se tomaron alícuotas del contenido de los fermentadores (40 ml) para llevar a cabo la extracción de su ADN. Tras este periodo de adaptación y durante 3 días, se recogieron los efluentes de cada uno de los fermentadores y se prepararon distintas alícuotas: 1 ml para la determinación

de la concentración de AGVs, 1 ml para determinar la concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ y 5 ml para la determinación del contenido en nitrógeno total. El resto del efluente se dividió en 2 partes iguales, una para el aislamiento de un *pellet* bacteriano y otra se liofilizó para, posteriormente, llevar a cabo los análisis de composición química correspondientes. Además, el 5^o día del experimento se tomaron muestras (40 ml) de los efluentes en frascos estériles para llevar a cabo la extracción de ADN.

Para el aislamiento del *pellet* bacteriano del efluente se utilizaron, aproximadamente, 400 ml que se homogeneizaron en una batidora durante 10 segundos a baja potencia. Este homogeneizado se filtra a través de 4 capas de gasa y 1 capa de nylon (40 μm de tamaño de poro) y el filtrado (**Filtrado 1** = bacterias de la fase líquida del efluente) se guarda a 4°C para su posterior procesado. El sólido que queda en la gasa se mezcla con una disolución de NaCl al 0,9% (w:v) y metilcelulosa al 0,1% (w:v), previamente enfriada a 4°C, a razón de 3 ml de disolución por gramo de residuo sólido; esta mezcla se incuba a 39°C con agitación continua (65 oscilaciones/min) durante 15 minutos y, seguidamente, se somete a golpeteo mecánico (Masticador IUL Instruments GmbH) durante 5 minutos, a razón de 230 golpes/min, y este homogeneizado se guarda a 4°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, el homogeneizado se mezcla en batidora (10 segundos a baja potencia) y se filtra a través de 4 capas de gasa y 1 capa de nylon (40 μm de tamaño poro). El filtrado obtenido (**Filtrado 2** = bacterias de la fase sólida del efluente) se une al **Filtrado 1** y la mezcla resultante se somete a centrifugación diferencial para separar las bacterias del líquido que las contiene. Se empleó una centrífuga Sorvall RC-6 Plus (Thermo Fisher Scientific Inc.) en la que la temperatura del rotor se mantenía a 4°C. La primera centrifugación se realizó a 500 x *g* durante 10 minutos para eliminar las partículas de alimento y los protozoos menores de 50 μm . El *pellet* obtenido se descarta y el sobrenadante se centrifuga a 20.000 x *g* durante 30 minutos. En esta ocasión se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en 20 ml de disolución de NaCl al 0,9% (w:v), y se centrifuga de nuevo a 20.000 x *g* durante 30 minutos. El *pellet* obtenido en esta última centrifugación representa las bacterias del efluente (BE). Una vez liofilizado este *pellet*, se determina su contenido en MS, MO, nitrógeno total y BP.

3.5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS Y CÁLCULOS

3.5.1. Análisis de composición química

El análisis químico de las dietas experimentales y de sus ingredientes, de los efluentes de los fermentadores y de los residuos no digeridos de los cultivos no renovados de microorganismos ruminales se llevó a cabo siguiendo los procedimientos descritos en el boletín de la “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC, 2005) para la determinación de MS, MO, nitrógeno total, fracciones fibrosas –fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y lignina (LAD) – y extracto etéreo (EE). Los protocolos están ampliamente descritos en tesis doctorales anteriores del grupo (Martín-García, 2001; Moumen, 2003; Yáñez-Ruiz, 2003).

3.5.2. Construcción de las curvas de la cinética de producción de gas en los sistemas de cultivos no renovados de microorganismos ruminales

El volumen de gas producido en los CNRMR se correlaciona con el tiempo, ajustando la nube de puntos mediante el *software* STATGRAPHICS (v. Centurion XV.II, Statpoint Technologies Inc.) al siguiente modelo matemático:

$$y = A \times (1 - e^{-ct})$$

En esta ecuación “y” representa la producción de gas (ml) para un determinado tiempo de incubación (t); “A” y “c” son dos constantes, que representan la asíntota o producción potencial de gas (ml) y la velocidad de producción de gas o de degradación del sustrato (h⁻¹), respectivamente.

La función obtenida mediante el ajuste de regresión exponencial permite calcular la producción de gas a distintos tiempos y construir así la curva de la cinética del proceso para cada dieta. Los gráficos que se muestran en la **Figura 4.4.1** de la **publicación 4** se realizaron utilizando los valores medios correspondientes a cada hora de incubación, para cada dieta experimental. La cantidad de gas producido a las 24 horas de incubación en los frascos de cultivo se expresa en relación a la de MS incubada y a la de MS verdaderamente digerida tras ese tiempo de incubación.

3.5.3. Digestibilidad de nutrientes en cultivos no renovados de microorganismos ruminales y en fermentadores de flujo continuo simple

Los coeficientes de digestibilidad aparente de la MS y de la FND de las dietas incubadas en los frascos de cultivos no renovados de microorganismos ruminales, así como de los carbohidratos presentes en la dieta, en el caso de los fermentadores, se calcularon en base a la siguiente expresión:

$$\frac{\text{Ingesta}_{\text{ nutriente}} - \text{Excrección}_{\text{ nutriente}}}{\text{Ingesta}_{\text{ nutriente}}} \times 100$$

La digestibilidad verdadera de la MS, en los CNRMR, se calculó teniendo en cuenta el contenido en FND del residuo tras la incubación, de tal modo que la expresión matemática para la misma sería (van Soest *et al.*, 1966):

$$\frac{\text{MS}_{\text{ ingerida}} - \text{FND}_{\text{ residual}}}{\text{MS}_{\text{ ingerida}}} \times 100$$

La digestibilidad verdadera de la MO en los fermentadores se calculó, detrayendo de la cantidad de MO recogida en el efluente, la MO de origen bacteriano:

$$\frac{\text{MO}_{\text{ ingerida}} - (\text{MO}_{\text{ residual}} - \text{MO}_{\text{ bacteriana}})}{\text{MO}_{\text{ ingerida}}}$$

La digestibilidad de los carbohidratos (CHO) en los fermentadores se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\frac{\text{CHO}_{\text{ ingeridos}} - (\text{CHO}_{\text{ residuales}} - \text{Hexosas}_{\text{ empleadas}}_{\text{ para}}_{\text{ producir}}_{\text{ AGVs}})}{\text{CHO}_{\text{ ingeridos}}}$$

Los CHO tanto ingeridos como residuales se calculan como: OM - (CP + EE). Los CHO residuales se corrigen con las hexosas generadas en la producción de AGVs mediante la expresión de Demeyer y van Nevel (1979):

$$\left(\frac{1}{2} \text{mmol}_{\text{ Acético}} + \frac{1}{2} \text{mmol}_{\text{ Pr opiónico}} + \text{mmol}_{\text{ Butírico}}\right) \times Pm_{\text{ Hexosas}}$$

3.5.4. Caracterización y cuantificación de los productos de la fermentación ruminal

3.5.4.1. Ácidos grasos volátiles (AGVs)

La cuantificación de los AGVs y de las proporciones molares de acético, propiónico, isobutírico, n-butírico, isovalérico y n-valérico se llevó a cabo en muestras del contenido de los frascos Wheaton tras 24 y 72 horas de incubación y de los efluentes de los fermentadores. La alícuota en la que se analiza la concentración de los AGVs se mezcla con 1 ml de una disolución de ácido metafosfórico (2%) y ácido crotónico (0,4%) en HCl 0,5M. El protocolo de extracción y cuantificación empleado está basado en el de Jouany (1982), con ligeras variaciones, y se encuentra ampliamente descrito en tesis anteriores del grupo (Martín-García, 2001; Moumen, 2003; Yáñez-Ruiz, 2003). La producción de AGVs se calcula a partir de la correspondiente concentración y la cantidad de medio de incubación en los frascos de CNRMR o del efluente, en el caso de los FFCS. En el caso de los CNRMR, la producción de AGVs se corrigió deduciendo los AGVs determinados en el inóculo ruminal antes de incubar. La eficiencia de producción de ácidos grasos volátiles en el experimento de FFCS se expresó en base a las cantidades de carbohidratos o MO digeridos.

3.5.4.2. Nitrógeno amoniacal

La determinación de la concentración de amonio se llevó a cabo en muestras del contenido de los frascos Wheaton, tras 24 horas de incubación, y de los efluentes de los fermentadores. La alícuota a analizar se adiciona de 1 ml de HCl 0,5M para acomplejar el amonio e impedir su volatilización. El protocolo de análisis está basado en el propuesto por Weatherburn (1967) y se encuentra descrito detalladamente en tesis anteriores del grupo (Martín-García, 2001; Moumen, 2003; Yáñez-Ruiz, 2003). En fermentadores, la producción total de N amoniacal se calcula a partir de su concentración en el efluente y de la cantidad media diaria de efluente producido.

3.5.4.3. Nitrógeno microbiano

La proteína microbiana, fundamentalmente de origen bacteriano, resultante de la fermentación de las dietas experimentales en los fermentadores de flujo continuo simple, se expresa en términos de flujo de nitrógeno no amoniacal (NNA) de origen microbiano en el efluente o FNM. Para el cálculo del mismo se emplea la siguiente expresión:

$$FNM = FNNA \times (BP : NEF / BP : NBE)$$

FNM = flujo de nitrógeno microbiano, [*mg / fermentador / día*]; FNNA = flujo de nitrógeno no amoniacal, [*mg / fermentador / día*]; BP:NEF = relación bases púricas: nitrógeno en el efluente, [*μmol / mg*]; BP:NBE = relación bases púricas: nitrógeno en el *pellet* BE, [*μmol / mg*].

La eficiencia de la síntesis de proteína microbiana se expresa en base a la MO ingerida, la MO verdaderamente fermentada o los carbohidratos digeridos.

La determinación del contenido en bases púricas en efluentes y en sus correspondientes *pellets* bacterianos se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Balcells *et al* (1992), descrito en tesis anteriores del grupo (Moumen, 2003).

3.5.5. Estudio de la microbiota ruminal

3.5.5.1. Extracción de ADN

Las muestras de material liofilizado, disgregado y homogeneizado de forma somera con una espátula estéril, se depositan en tubos estériles de 2 ml con tapón de rosca, llenando aproximadamente hasta $\frac{3}{4}$ del volumen de estos frascos y se añaden 3 bolas de acero de un diámetro de 2,3 mm, previamente esterilizadas. El procedimiento se lleva a cabo en condiciones estériles, esto es en una campana de flujo laminar y utilizando alcohol etílico para desinfectar los instrumentos. Los frascos con las muestras se guardan a -80°C durante un tiempo aproximado de 15 minutos, con el fin de reducir la posibilidad de degradación del material genético por calentamiento excesivo, provocado por el alto grado de rozamiento en el dispositivo agitador. Los tubos se someten a una intensa pulverización a 5.000 rpm

introduciéndolos en un agitador Mini-Beadbeater-8 (Bio Spec Products Inc.) durante 1 minuto, para asegurar una óptima homogeneización de las muestras previa a la extracción de ADN.

La extracción de ADN se lleva a cabo utilizando el kit de extracción QIAmp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen GMBH) siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones. Puesto que el material de partida se encuentra liofilizado y, por tanto, con una alta concentración de ADN, se toma una cantidad menor (30-50 mg) a la indicada en el protocolo del fabricante para muestras frescas (180-220 mg). Para maximizar la extracción de ADN la temperatura se eleva a 95°C en aquellos pasos en que el protocolo lo recomienda para la rotura de la pared de bacterias Gram positivas, resistentes a temperaturas elevadas. La aplicación conjunta de métodos físicos (Mini BeadBeater) y químicos (QIAmp® DNA Stool Mini Kit), junto con la elevación de la temperatura durante la extracción evita la lisis preferencial de bacterias y, por tanto, posibilita el aislamiento no selectivo del ADN de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Frostegard *et al.*, 1999).

3.5.5.2. Cuantificación de grupos microbianos: PCR en tiempo real (RT-qPCR)

Los cebadores empleados para cuantificar las poblaciones de bacterias, arqueas metanogénicas, hongos y protozoos, así como de *Fibrobacter succinogenes* (*F. succinogenes*) y *Ruminococcus flavefaciens* (*R. flavefaciens*) se encuentran detallados en las **Tablas 4.2.2** y **4.3.3** de las **publicaciones 2** y **3**, respectivamente.

El fluorocromo SYBR Green I, debido a su inespecificidad por el ADN de cadena doble, puede marcar también amplificaciones no específicas o dímeros de cebadores. Es necesario, por tanto, llevar a cabo una optimización del proceso para evitar la formación de este tipo de artefactos. A fin de determinar la temperatura óptima de anillamiento en la PCR, se programó un protocolo de amplificación con una rampa de temperaturas en un rango de 55 a 62°C. La temperatura de anillamiento óptima, que no producía amplificaciones indeseadas o los citados dímeros, fue de 60°C en todos los casos. El protocolo de amplificación usado para

la cuantificación de los distintos grupos microbianos y para la construcción de la curva de disociación se detalla en la **Tabla 3.2, incluida en este apartado.**

Tabla 3.2. Protocolo de amplificación y generación de la curva de disociación utilizado en RT-qPCR.

	Temperatura	Duración	Nº repeticiones
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	15 segundos	
Anillamiento de cebadores	60°C	30 segundos	40 ciclos
Elongación de cebadores	72°C	55 segundos	
Detección de fluorescencia	75°C	6 segundos	
Desnaturalización del ADN,	95°C	1 minuto	1 ciclo
previa a la curva de disociación	75°C	1 minuto	
Construcción de la curva de	55°C	10 segundos	1 ciclo

La mezcla de amplificación (25 µl) contenía:

- Un par de cebadores específicos a una concentración de 0,4 µM cada uno.
- iQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc.) al 1X con: KCl 100 mM; Tris-HCl 40mM pH 8,4; 0,4 mM de cada dNTP, MgCl₂ 6mM, fluoresceína 20nM, SYBR Green I, estabilizadores y 0,05 U/µl de *iTaq* ADN polimerasa.
- 15-70 ng de ADN molde.

Cuantificación absoluta de poblaciones microbianas

Los microorganismos considerados en los **experimentos 2, 3, 4 y 5** se cuantificaron de forma absoluta, en base al número de copias de fragmentos pertenecientes a las siguientes regiones génicas o intergénicas:

- El ADN- r 16S en el caso de bacterias (Maeda *et al.*, 2003), *F. succinogenes* y *R. flavefaciens* (Denman y McSweeney, 2006).
- El ADN- r 18S en el caso de protozoos (Sylvester *et al.*, 2004).

- Parte de la región espaciadora ITS1 (*Internal Transcribed Spacer 1* o región espaciadora de genes ribosómicos 1) y parte del gen 18S en el caso de hongos (Denman y McSweeney, 2006).

- El gen *mcrA* para arqueas metanogénicas (Denman *et al.*, 2007).

Para determinar el número de copias de los fragmentos génicos mencionados, se prepararon diluciones seriadas de un estándar y se construyó una recta patrón de calibrado. El estándar empleado fue el plásmido comercial pCR[®]4-TOPO (Invitrogen[™]), portador de la secuencia problema a cuantificar. La construcción de estos plásmidos se realizó mediante clonación y transformación de células competentes de *Escherichia coli* (cepas comerciales One Shot[®] TOP10, Invitrogen[™]) siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido es portador del gen codificante de la β -galactosidasa (*lacZ*), enzima que hidroliza la lactosa a glucosa y galactosa y que también es capaz de actuar sobre un compuesto orgánico denominado "X-gal" (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido), que es hidrolizado a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol. Este último producto se oxida a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble. Al adicionar el X-gal y, en ocasiones un inductor de la expresión de la enzima β -galactosidasa denominado "IPTG" (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido), al medio de cultivo sólido aquellas colonias de bacterias con plásmidos no recombinantes (que poseen un gen *lacZ* funcional) se distinguen por su coloración azul de las colonias de bacterias con plásmidos recombinantes, de color blanco (que portan una secuencia foránea dentro del gen *lacZ*, que, al interrumpir la secuencia del gen, impide su expresión y, por tanto, estas bacterias no producen β -galactosidasa). Para eliminar del medio aquellas bacterias que no han adquirido el plásmido (recombinante o no), se adiciona un antibiótico o una combinación de antibióticos: ampicilina y/o kanamicina. Solo las bacterias portadoras (bacterias transformadas) del plásmido pueden crecer, ya que solo en la secuencia del mismo se encuentran los genes de resistencia a estos antibióticos.

Tras la selección visual de las potenciales bacterias portadoras de la construcción genética, se verifica la presencia del fragmento de interés mediante PCR. A continuación, se extrae el plásmido mediante un kit Miniprep comercial y se secuencian el fragmento. El cotejado de la secuencia de nucleótidos obtenida, con

información de alguna base de datos de secuencias (por ejemplo, Nucleotide del NCBI) mediante algún tipo de *software* de alineamiento tipo BLAST (NCBI), permitirá asegurar la presencia del fragmento deseado en el plásmido. A partir del peso molecular del plásmido con el inserto y de la concentración del mismo en cada extracto plasmídico, se puede conocer el número de copias del plásmido, el cual es igual al número de copias del fragmento de interés, en cada una de las diluciones realizadas.

Cuantificación relativa de poblaciones microbianas

Los grupos de arqueas metanogénicas, hongos y protozoos, junto con las especies bacterianas *F. succinogenes* y *R. flavefaciens* también se cuantificaron en relación a la población total de bacterias (**experimento 2**), empleándose, en este caso, la secuencia del gen ribosómico 16S de bacterias como gen de referencia. El método de cuantificación empleado fue el propuesto por Denman y McSweeney (2005), cuya expresión matemática es:

$$2^{(-\Delta C_T)}$$

Siendo $-\Delta C_T = C_T$ bacterias totales – C_T grupo o especie a cuantificar.

3.5.5.3. Evaluación de la diversidad y estructura de las poblaciones bacterianas

Denaturing Gel Gradient Electrophoresis (DGGE)

En esta técnica, la región seleccionada para llevar a cabo el *screening* de la población bacteriana corresponde a la sección variable V3 del gen para el ARN ribosómico 16S (Muyzer *et al.*, 2003). Los cebadores se detallan en la **Tabla 4.2.2** de la **publicación 2**. El protocolo de amplificación aparece en la **Tabla 3.3**.

Tabla 3.3. Protocolo de amplificación utilizado para DGGE.

	Temperatura	Duración	Nº repeticiones
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	94°C	15 segundos	
Anillamiento de cebadores	58°C	15 segundos	33 ciclos
Elongación de cebadores	72°C	30 segundos	
Elongación final de cadenas	72°C	10 minutos	1 ciclo

Se programaron 2 amplificaciones anidadas (*nested* PCR) con dos parejas de cebadores. Los cebadores *forward* de la 1ª y la 2ª reacción eran prácticamente similares, con solo una secuencia diferente de 40 pb, cola GC, en el segundo caso. El hecho de programar 2 PCRs encadenadas soluciona errores de unión de los cebadores a secuencias que no son sus dianas, lo cual genera amplicones no específicos. En una *nested* PCR este hecho se minimiza puesto que en la 2ª reacción de amplificación el ADN molde disponible consiste, mayoritariamente, en los amplicones de la 1ª reacción.

La mezcla de amplificación (25 µl) en la 1ª PCR contenía:

- Tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA) al 1X.
- MgCl₂ 2 mM.
- dNTPs 0.8 mM.
- 2 µM de cada cebador.
- 1 U de *Taq* polimerasa (Dominion – MBL).
- AND molde en una cantidad que oscilaba entre 30 y 140 ng.

En la 2ª PCR, se empleó una cantidad doble de los reactivos mencionados y de ADN molde (procedente de la 1ª amplificación), contenidos en un volumen final de 50 µl.

Los productos resultantes de la 2ª PCR se cargaron en un gel de poliacrilamida al 9%, compuesto de acrilamida:bisacrilamida en una proporción 37,5:1 (Sigma-Aldrich Corp.), con un gradiente desnaturizante 45 - 75% de urea y formamida,

establecido empíricamente. La acrilamida polimeriza por la acción de un agente entrecruzante, la bis-acrilamida, en presencia de un agente iniciador denominado “TEMED” (N,N,N,N'-tetrametilnediamina, 12 µl) y de un agente catalizador, el ión persulfato ($S_2O_8^-$), que se añade en forma de persulfato amónico (120 µl) a la mezcla. Una vez que el gel ha polimerizado, se carga una mezcla de producto de PCR y tampón de carga en los pocillos del mismo. Se aplica una diferencia de potencial de 200 V durante 20 minutos y, a continuación, 75 V durante 16 horas. Tras la electroforesis, el gel se tiñe con el kit Silver Staining de Bio-Rad, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez teñido, el gel se escanea y la imagen digitalizada del mismo se emplea para asignar y alinear las bandas de las distintas muestras, mediante el *software* Quantity One 1-D v 4.6.7. (Bio-Rad Laboratories Corp.). El programa convierte las bandas detectadas y alineadas en una matriz de datos, que en nuestro caso era de tipo binario (1 – 0), puesto que no se tuvo en cuenta la intensidad de las bandas sino solo su presencia o ausencia.

Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

La región seleccionada para llevar a cabo el *screening* de toda la población bacteriana es, en este caso, la mayor parte del ADNr 16S (aproximadamente 1.300 pb, Hongoh *et al.*, 2003). Los cebadores empleados aparecen detallados en las **Tablas 4.2.2** y **4.3.3** de las **publicaciones 2** y **3**, respectivamente. El protocolo de amplificación programado se detalla en la **Tabla 3.4**.

Tabla 3.4. Protocolo de amplificación empleado para T-RFLP.

	Temperatura	Duración	Nº repeticiones
Desnaturalización inicial	94°C	4 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	94°C	1 minuto	
Anillamiento de cebadores	55°C	1 minuto	25 ciclos
Elongación de cebadores	72°C	1 minuto	
Desnaturalización	94°C	1 minuto	
Anillamiento de cebadores	55°C	1 minuto	1 ciclo
Elongación de cebadores	72°C	5 minutos	
Elongación final de cadenas	72°C	5 minutos	1 ciclo

La mezcla de reacción (25 µl) contenía:

- Tampón TAE al 1X.
- MgCl₂ 2mM.
- dNTPs 0,8mM.
- 1mM de cada cebador.
- 1 U *Taq* polimerasa (Dominion – MBL)
- 15-70 ng de ADN molde.

Los productos de PCR se purifican mediante el kit de PCR QuickClean Kit (Dominion – MBL). Los amplicones purificados se someten, a continuación, a una digestión enzimática empleando las enzimas de restricción *HhaI*, *HaeIII* y *MspI* en 3 reacciones diferentes. La mezcla de digestión (20 µl) en cada una de ellas incluye:

- 20 ng de DNA amplificado.
- Tampón de restricción al 1X.
- 1 U de endonucleasa de restricción (Roche Diagnostics GMBH).

Las muestras se sellan con parafilm y se incuban durante 5 horas a 37°C en estufa, tras lo cual se inactivan a 80°C durante 20 minutos para detener la reacción enzimática. A continuación, las muestras se purifican y pueden conservarse a -20°C

hasta su análisis. Para llevar a cabo éste análisis se mezclan 2 µl de cada una de ellas con 0,3 µl del marcador de tamaño molecular GeneScan-600 LIZ (Applied Biosystems Inc.) y 12 µl de formamida desionizada (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems Inc.). Esta mezcla se desnaturaliza a 90°C durante 2 minutos y se enfría inmediatamente en hielo, durante al menos, 5 minutos. Las muestras se inyectan en un dispositivo secuenciador 3130xl Genetic Analyzer ABI PRISM (Applied Biosystems Inc.) y se separan en un polímero de electroforesis POP7 en capilares de 50 cm. Todas las muestras se analizan conjuntamente mediante el *software* GeneMapper v 4.0 (Applied Biosystems Inc.) y los picos se alinean mediante el módulo de análisis para AFLPs. Se establece un umbral mínimo de 40 unidades de fluorescencia para la asignación de un pico, por debajo del cual la fluorescencia detectada se considera “ruido analítico”. Para obtener los genotipos (perfil de fragmentos de restricción terminales o perfil de FRTs de cada muestra) se asigna 1 a la presencia de pico y 0 a su ausencia, en cada una de las posiciones determinadas por el panel de posibles alelos. Los datos relativos a la altura, área, tiempo de retención y tamaño estimado (en pb) de cada uno de los alelos se transfieren a una hoja de cálculo. A continuación, se normalizan las alturas dividiendo sus valores por la suma total de alturas de los picos presentes en las muestras, obteniéndose una matriz de alturas relativas. Se eliminan todos aquellos picos normalizados cuya altura relativa represente menos del 0,5%, para separar el ruido analítico de aquellos picos que sí representan fragmentos de ADN. La normalización de los datos favorece una comparación más equitativa entre muestras que puedan presentar concentraciones diferentes de ADN, como consecuencia de errores en los que puede incurrirse al pipetear, durante el proceso de preparación de las muestras (Dunbar *et al.*, 2001). Esto genera resultados mucho más fiables puesto que la mayor parte de variabilidad, en esta técnica, se debe a diferencias en la concentración del ADN cargado en la electroforesis (Osborn *et al.*, 2000; Dunbar *et al.*, 2001).

Cálculo de la riqueza específica y diversidad

Los datos binarios (1-0) de las matrices de DGGE se emplean para el cálculo de la riqueza en bandas, expresada como la suma de todas ellas, en cada una de las muestras. Los datos de alturas relativas de las matrices de T-RFLP se usan para el cálculo de la diversidad, según el índice de Shannon:

$$H' = - \sum_{i=1}^S (P_i \ln P_i), \text{ donde } P_i \text{ es el porcentaje de individuos de la especie } i. \text{ (Wiener,}$$

1948; Shannon y Weaver, 1949).

y del de la homogeneidad de Shannon o *evenness*:

$$E = H' (\ln S)^{-1}, \text{ donde } S \text{ es el número total de especies (Magurran, 1988).}$$

Análisis multivariante de los datos de DGGE y T-RFLP

Las matrices binarias de bandas del gel DGGE y de alturas relativas de los FRTs se analizan mediante análisis cluster y/o métodos de ordenación usando el *software* CAP 4 (Community Analysis Package v 4.1.3., Pisces Conservation Ltd.).

Los datos de T-RFLP incluidos en la **publicación 1** se sometieron a un análisis cluster, construyéndose los dendrogramas en base al método de agrupación aglomerativo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*; Sokal y Michener, 1958; Murtagh, 1984) y el algoritmo de cálculo de distancias de Bray-Curtis (Bray y Curtis, 1957). Los dendrogramas que aparecen en la publicación 2, contruidos tanto a partir de los datos de DGGE como de T-RFLP, se obtuvieron aplicando el método UPGMA y un algoritmo de cálculo de distancias inverso al coeficiente de similitud de Sørensen (Sørensen, 1948), esto es 1 - índice de Sørensen. Estos datos se sometieron igualmente a un análisis NM-MDS (*Non-metric multidimensional scaling*) aplicando el coeficiente de Sørensen para el cálculo de similitudes. Los grupos obtenidos mediante análisis cluster se validaron mediante el test no paramétrico ANOSIM (*analysis of similarities* o análisis de similitudes).

Asignación de filotipos

Los FRTs detectados, para cada una de las tres digestiones enzimáticas realizadas en la T-RFLP, permiten llevar a cabo asignaciones filogenéticas usando determinadas herramientas bioinformáticas. En la **publicación 2**, se llevó a cabo la asignación de filotipos para ciertas combinaciones de FRTs. La selección de estas combinaciones de fragmentos de restricción se realizó teniendo en cuenta, en primera instancia, los fragmentos generados por la enzima *HhaI*. Esta enzima proporciona una cobertura más representativa de los organismos que integran una comunidad, ya que produce menos sesgos hacia determinados grupos microbianos que otras endonucleasas de restricción (Clement *et al.*, 1998; Marsh, 1999). La **Figura 3.4** muestra la secuencia en que se llevó a cabo la selección de fragmentos e identificación de los organismos correspondientes. Para llevar a cabo la identificación bacteriana, en primer lugar se elaboró una base de datos de todas las especies potencialmente identificables, utilizando los cebadores 27F y 1389R (ver **Tabla 4.2.2** de la **publicación 2**) y las enzimas de restricción *HaeIII* (GG*CC), *HhaI* (GCG*C), y *MspI* (C*CGG), mediante la aplicación Virtual Digest (ISPaR), que aparece en el sitio *web* MiCA 3 (*Microbial Community Analysis III*; <http://mica.ibest.uidaho.edu/digest.php>; Shyu *et al.*, 2007). Esa base de datos se modificó de forma que todas aquellas especies bacterianas con idéntica longitud de sus FRTs, para una misma enzima, se reducían a una sola entrada en la base de datos, y, además, se eliminaron todos los FRTs inferiores a 40 pb y superiores a 600 pb. Para generar datos sobre la diversidad bacteriana, en cada nivel filogenético, el número de acceso proporcionado por MiCA 3 se utiliza para obtener una clasificación filogenética completa de dicha especie, con la ayuda del sitio *web* RDP II (<http://rdp.cme.msu.edu/>; Cole *et al.*, 2009), de tal forma que el nombre de la especie bacteriana identificada se reemplaza por su clasificación completa. Así, por ejemplo, "*Lactobacillus brevis* HDRS2", se reemplaza por su clasificación completa: filum Firmicutes, clase Bacilli, orden Lactobacillales, familia Lactobacillaceae, género *Lactobacillus*, especie *Lactobacillus brevis* HDRS2. La asignación filogenética de los FRTs de cada muestra se establece utilizando el programa de asignación filogenética PAT (*T-RFLP Phylogenetic Assignment Tool*; <https://secure.limnology.wisc.edu/trflp/>; Kent *et al.*, 2003), con la base de datos

creada previamente y la elección de un criterio de “tolerancia de tamaño” polinomial (1.0, 1.5 y 4.0 pb de tolerancia para fragmentos de hasta 200, 400 y 600 pb, respectivamente), que tiene en cuenta que las discrepancias entre el tamaño de los FRTs teóricos y observados aumentan al hacerlo el tamaño de los mismos.

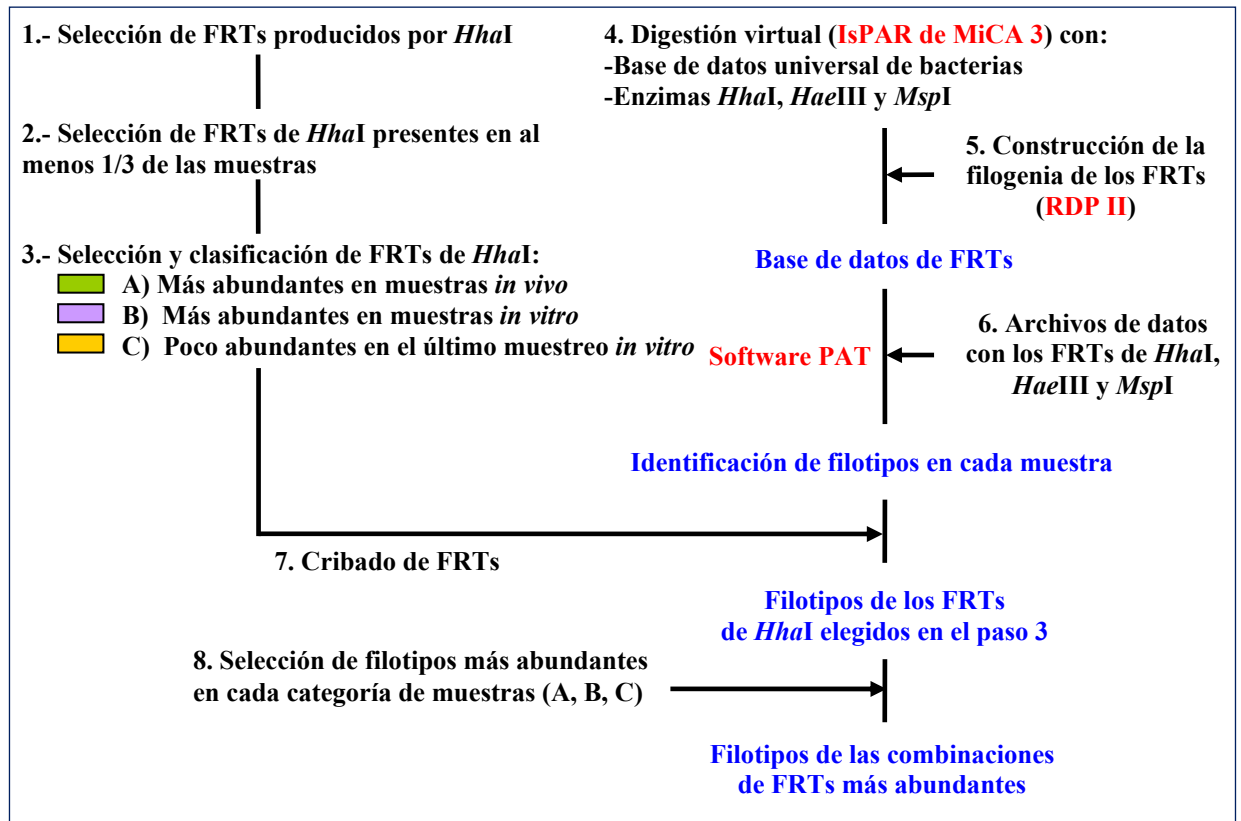


Figura 3. 4. Esquema del proceso de identificación bacteriana a partir de los datos obtenidos por la aplicación de la técnica T-RFLP.

3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) para Windows (IBM SPSS Statistics v.19, IBM Corp.), con alguno de los siguientes modelos:

- **Análisis de modelo lineal general (GLM) univariante.** Se empleó para el análisis conjunto de 2 factores y su interacción. Mediante este análisis se estudió el efecto del momento del muestreo, del tipo de dieta y de la interacción de ambos factores sobre la abundancia de las poblaciones detalladas en el **apartado 3.5.5.2** y sobre la riqueza específica y diversidad bacterianas que se presentan en la **publicación 2**. También se empleó para estudiar el efecto del tipo de destrío y de su nivel de inclusión en la dieta sobre diversos parámetros de la fermentación, tanto en CNRMR como en FFCS, en la **publicación 4**.

- **Análisis de la varianza unifactorial (ANOVA simple o univariante).** Este tipo de análisis se emplea para conocer si existen diferencias entre los tratamientos debidas a un solo factor. Este análisis estadístico se empleó en la **publicación 3** para analizar el efecto del tiempo de incubación sobre las poblaciones microbianas detalladas en el **apartado 3.5.5.2**, en diversos sistemas *in vitro* (incubador Daisy^{II}, CNRMR y FFCS), y de la dieta sobre estas mismas poblaciones en FFCS. Cuando existían diferencias significativas ($P < 0,05$) debidas a cualquier factor analizado, con alguno de los anteriores modelos, se realizó una comparación entre medias utilizando un test de comparaciones múltiples *post-hoc*: el de Bonferroni en la **publicación 2** y el LSD en las **publicaciones 3 y 4**.

Capítulo 4

Resultados

Publicación 1

**Study of the animal to animal variability in
bacterial community structure in the goats' rumen**

D. R. Yáñez-Ruiz*, E. C. Soto*, C. J. Newbold, and E. Molina-Alcaide***

**Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda, 1, 18008 Granada, Spain*

***IBERS, Aberystwyth University, Llanbadarn Campus, SY23 3AL, United Kingdom*

(En prensa, Options Méditerranéennes)

Abstract. The use of classical culture and, more recently, modern molecular techniques to study microbial diversity in the rumen show a high animal to animal variability and, sometimes, contradictory information on diurnal variation pattern in their numbers. This work aimed to study the animal variation in diversity of rumen bacterial community within an established flock of Granadina goats. In a first period (I), three adult goats cannulated in the rumen were fed alfalfa hay for a month and samples of rumen contents collected at 0, 2 and 4 hours after the morning feeding in two non consecutive days. In two consecutive additional periods, rumen content was transferred between animals and samples collected 2 h after the morning feeding in two non consecutive days. Total DNA was extracted from rumen samples and T-RFLP used to monitor bacterial dynamics. In Period I the bacterial profiles of each animal clustered separately, and were very similar along the day with no apparent differences between sampling day. In Periods II and III the animal was still the main clustering factor. Our results show that within an established flock of goats each animal harbours its own bacterial community and that there seems to be a day-to-day stability.

Key words: Animal variability – Alfalfa hay – Molecular techniques – Rumen – T-RFLP

Etude de la variabilité animal dans la structure de la communauté bactérienne ruminale de caprins

Resumé. La culture classique et les techniques moléculaires montrent une haute variabilité parmi des animaux dans la diversité microbienne du rumen et, parfois, une contradiction concernant la variation diurne de la quantité de bactéries. Ce travail étudie la variation des animaux dans la diversité de la communauté des bactéries du rumen chez chèvres de la rase Granadina cannulées dans le rumen. Dans une première période (I) les animaux ont été nourris au foin de luzerne pour l'entretien pendant un mois et des échantillons du contenu du rumen ont été collectés à 0, 2 et 4 heures après la nourriture de la matinée et dans deux jours consécutifs. Pour évaluer la cohérence des différences observées dans la période I, le contenu du rumen a été transféré entre les animaux dans les périodes II et III au

cours des lesquelles les animaux ont également été nourris avec de foin de luzerne. Des échantillons du contenu du rumen ont été prélevés après 2 h de la nourriture du matin et pendant deux jours consécutifs. L'ADN a été extrait des échantillons le terminal restriction fragment polymorphism (T-RFLP) utilisée pour étudier la dynamique bactérienne. Dans la période I les profils bactériennes de chaque animal se sont regroupées séparément et ils étaient très semblables le long de la journée avec aucune différence apparente entre l'échantillonnage provenant de différent jours. Dans les périodes II et III les différences entre les animaux dans la structure de la communauté des bactéries ont été réduites après l'échange de contenu du rumen bien que l'animal semble être le facteur clé de clustering. Dans le cadre d'un troupeau de chèvres établis chaque animal port sa propre communauté des bactéries et il semble y avoir une stabilité jour à jour au cours d'une couple de semaines, ce qui a des implications importantes pour la conception des protocoles expérimentaux.

Mots-clés: *Variabilité des animaux - Foin de luzerne - Techniques moléculaires - Rumen - T-RFLP*

INTRODUCTION

The microbial population in the rumen is composed of a complex mixture of bacteria, protozoa, fungi, archaea and phage (Dehority, 2003). Each of these groups comprises a collection of species that are genetically and biochemically diverse. This versatility complements the intricate physical structures of the microbial community within the ruminal ecosystem and enables ruminant animals to consume a wide variety of feedstuffs without causing large fluctuations in the amounts or types of microbial products produced (Wolstrup *et al.*, 1974). However, the species composition of the rumen microbial community has been shown to vary between individuals, different feeding regimes, intake levels, frequency of feeding and the postprandial time at which the rumen is sampled (Swain *et al.*, 1996).

These early works studying the composition of rumen microbial community were based on traditional cultivation-based approaches, which can only detect a low

proportion of the whole microbial population in the rumen (Edwards *et al.*, 2004). Advances in the development of molecular techniques for analysis of complex microbial communities have bypassed the necessity for cultivation and made considerable progress in characterization of the rumen microbial ecosystem (Wright *et al.*, 2004).

This work aimed to use modern molecular techniques to study the animal to animal variation and the day to day stability in the rumen bacterial community structure within an established flock of Granadina goats fed alfalfa hay at maintenance level.

MATERIAL AND METHODS

The trial was divided in 3 periods. In period I, three adult goats cannulated in the rumen were fed alfalfa hay at maintenance level (Prieto *et al.*, 1990) for a month and then samples of rumen contents collected at 0, 2 and 4 hours after the morning feeding on days 31 (d1) and 45 (d2). To evaluate the consistency of differences amongst animals observed in Period I, 1.5 kg of rumen content was swapped between animals in two additional periods (II and III), during which animals were also fed alfalfa hay for one month and samples collected on days 31 (d1) and 45 (d2) 2 hours after the morning feeding. In Period II the content was transferred from animal 1 to 2, from 2 to 3 and from 3 to 1. In Period III the rumen content was transferred from animal 2 to 1, from 3 to 2 and from 1 to 3.

Approximately 50 g of samples of rumen contents were freeze-dried and thoroughly mixed by physical disruption using a bead beater (Mini-bead Beater; BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) before DNA extraction, which was performed from approximately 50 mg sub-sample using the QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen Ltd, West Sussex, UK) following the manufacturer's instructions. DNA samples were used as templates for terminal restriction fragment polymorphism (T-RFLP) analysis (Hongoh *et al.*, 2005) to study total bacterial community structure: PCR was performed using a 16S rDNA universal primer pair, cyanine labelled 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTG AG-3') and unlabelled 1389R (5'-AGG GGG GGT GTG TAG AAG-3'). The PCR product was purified (Millipore

MultiScreen® PCR-96 plate with 20 inches Hg vacuum). The DNA concentration within each sample was determined by spectrophotometry (Nanodrop® ND-1000 spectrophotometer) and then diluted to 20ng/μl. Restriction enzyme digestion was performed using *HhaI* at 0.25 U/μl. Analysis of T-RF's in samples was performed by using the Bray-Curtis distance between binary profiles (presence/absence of peaks) to construct dendrograms. Analysis of the T-RFLP peaks profiles was carried out by CAP 4 software (Pisces Conservation Ltd., Lymington, Hampshire, UK).

RESULTS AND DISCUSSION

In Period I, as shown in **Figure 4.1.1**, the bacterial profiles of each animal clustered separately, and were very similar along the day with no apparent differences between d1 and d2. Animals 2 and 3 seemed to harbour a more similar bacterial community compared to animal 1, whose samples are in a separated cluster.

In Periods II and III (**Figure 4.1.2**) the similarity within each individual in T-RFLP profiles was reduced after exchanging rumen contents, which is shown by samples from Period I clustered together and those from periods II and III being less similar. However, the animal seemed to be the main clustering factor, as the dendrogram displays 3 main clusters.

Recent studies are showing that bacterial populations co-diversified with their hosts, being mainly influenced by animal species and diet preference, but with high bacterial-host specificity (Ley *et al.*, 2008). The coexistence of the host and microbial gut communities seems to be immunologically driven, and we are only beginning to understand the complex ways in which they adapt to each other (Winkler *et al.*, 2007). Host-level selection of specific members of a microbiota has been demonstrated under laboratory conditions by reciprocal transplantations of gut microbiota from one host species to germ-free recipients of a different species: groups of bacteria were expanded or contracted in the recipient host to resemble its "normal" microbiota through a process that may have been influenced by diet (Rawls *et al.*, 2006). Our results support the hypothesis that each animal's rumen

microbiota is host-specific and that in adult animals it is very resilience to experimental induced changes such as the transfer of rumen contents from one animal to another. Whether this specificity explains different digestive response when the rumen ecosystem is challenged with high quality or very poor diets needs to be further investigated.

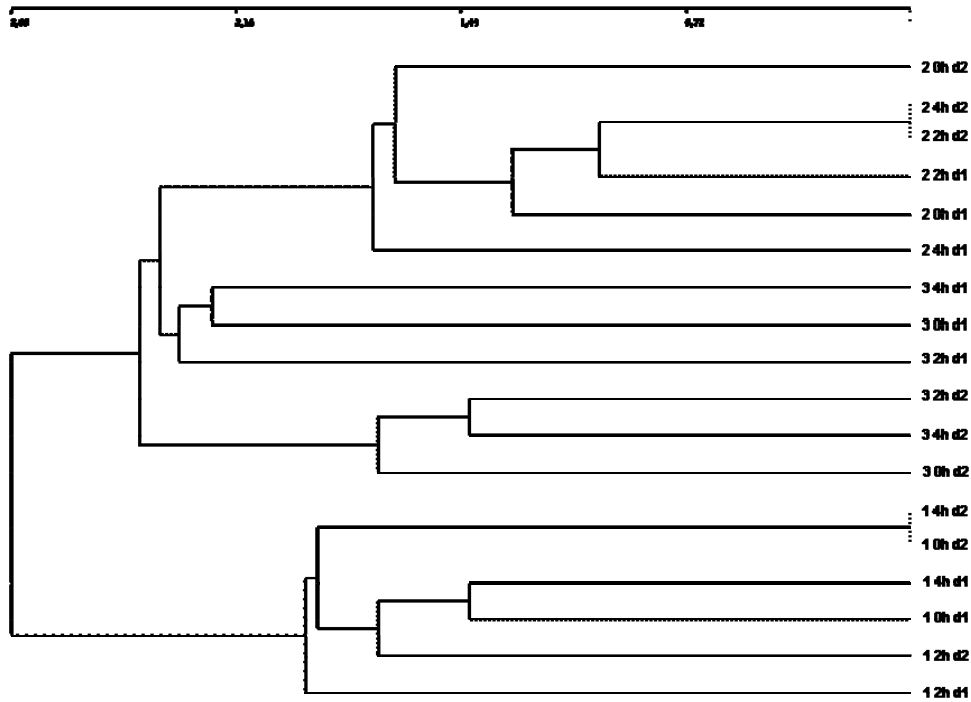


Figure 4.1.1. Dendrogram illustrating the effect of animal (1, 2 and 3), sampling time (0, 2 and 4 hours) and day (d1 and d2) on total bacteria (16s rRNA gene) T-RFLP patterns in Period I. The scale bars shows Bray-Curtis distances.

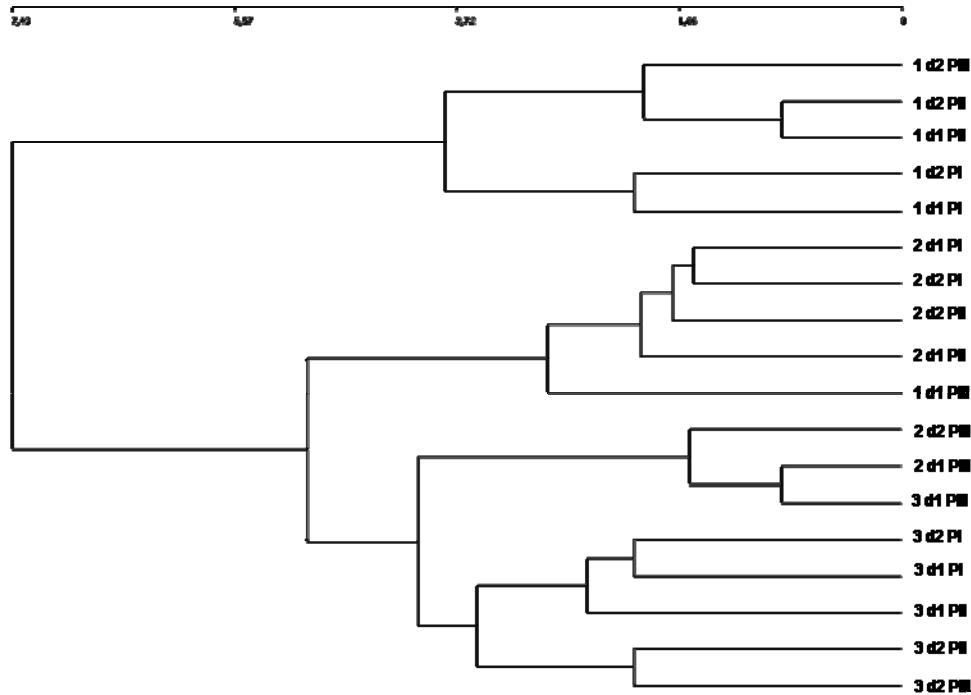


Figure 4.1.2. Dendrogram illustrating the effect of animal (1, 2 and 3), period (I, II and III) and sampling day (d1, d2) on total bacteria (16s rRNA gene) T-RFLP patterns. The scale bars shows Bray-Curtis distances.

Conclusions

Our results show that within an established flock of goats each animal harbours its own bacterial community and that there seems to be a day-to-day stability over the course of a couple of weeks, which has important implications for designing experimental sampling protocols.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support received from European Commission (METANORUMEN, Marie Curie ERG grants: ERG-224816) and technical assistance from I. Jiménez.

REFERENCES

- Dehority, B.A. 2003. Rumen microbiology. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Edwards, J.E., McEwan, N.R., Travis, A.J. and Wallace R.J. 2004. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. In: *Antonie van Leeuwenhoek*, 86. p. 263-281.
- Hongoh, Y., P. Deevong, T. Inoue, S. Moriya, S. Trakulnaleamsai, M. Ohkuma, C. Vongkaluang, N. Noparatnaraporn, and T. Kudo. 2005. Intra- and Interspecific comparisons of bacterial diversity and community structure support coevolution of gut microbiota and termite host. In: *Appl. Environ. Microbiol.*, 71. p. 6590-6599.
- Ley, R. E., M. Hamady, C. Lozupone, P. J. Turnbaugh, R. R. Ramey, J. S. Bircher, M. L. Schlegel, T. A. Tucker, M. D. Schrenzel, R. Knight, and J. I. Gordon. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. In: *Science*, 20. p. 1647-51.
- Prieto C., Aguilera J.F., Lara L. and Fonollá J. 1990. Protein and energy requirements for maintenance of indigenous Granadina goats. In: *Br J Nutr.*, 63. p.155-163.
- Rawls, J. F., M. A. Mahowald, R. E. Ley, and J. I. Gordon. 2006. Reciprocal Gut Microbiota Transplants from Zebrafish and Mice to Germ-free Recipients Reveal Host Habitat Selection. In: *Cell*, 127. p. 423-433.
- Swain R.A., Nolan J.V., and Klieve A.V. 1996. Natural and diurnal fluctuations within the bacteriophage population of the rumen. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 62, p. 994-997.
- Winkler, P., D. Ghadimi, J. Schrezenmeir, and J. P. Kraehenbuhl. 2007. Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. In: *J Nutr.* 137. p. 756S-72S.
- Wolstrup J., Jensen V, and Jensen K. 1974. The microflora and concentrations of volatile fatty acids in the rumen of cattle fed on single component ratios. In: *Acta Vet. Scand.* 15. p. 244-255.
- Wright A.D.G., Williams A.J., Winder B., Christophersen C.T., Rodgers S.L., and Smith K.D. 2004. Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in western Australia. In: *Appl. Environ. Microbiol.*, 70. p. 1263-1.

Publicación 2

Changes in goats' ruminal microbiota after rumen content processing and incubation in single-flow continuous-culture fermenters fed diets differing in forage to concentrate ratio

Eva C. Soto, David R. Yáñez-Ruiz, Gonzalo Cantalapiedra-Hijar, Astrid Vivas & Eduarda Molina-Alcaide

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

(Enviado a FEMS Microbiology Ecology)

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the changes in the main microbial groups inhabiting goats' rumen after rumen content manipulation, and 1- and 7 d of incubation in single-flow continuous-culture fermenters fed diets differing in forage to concentrate ratio (70:30; LC and 30:70; HC). Rumen contents were sampled after 10-d of adaptation to the experimental diets and inoculated into fermenters within 30 minutes. Fermenter contents were sampled 1 and 7 d after inoculation. Abundances of total bacteria, *Fibrobacter succinogenes*, fungi and methanogens, were lower in fermenter contents on day 1 after inoculation than in goats' rumen content, but no differences were found for *Ruminococcus flavefaciens*. The abundances of those microorganisms in fermenters remained the same 7 d after inoculation. Bacterial OTUs (operational taxonomic units) richness and diversity did not change either after transferring rumen content to fermenters or during *in vitro* incubation. Clustering pattern derived from DGGE and T-RFLP fingerprinting showed an *in vivo* - *in vitro* segregation, but no trends of grouping for fermenter samples existed. No effect of forage to concentrate ratio was observed either on microorganisms' numbers or on both bacterial community structure and diversity.

Keywords: goats, microbial populations, rumen, single-flow continuous-culture fermenters.

INTRODUCTION

Fermenters have shown to be a useful tool to study the ruminal fermentation (Giraldo *et al.*, 2007; Molina-Alcaide *et al.*, 2009). However, to truly simulate ruminal fermentation, microbiota in fermenters should represent that in the rumen (Ziemer *et al.*, 2000; Muetzel *et al.*, 2009). The adaptation of the ruminal microbial community to *in vitro* conditions is critical to achieve its representativeness and to ensure that observed effects are due to the experimental treatments (Castillejos *et al.*, 2007; van den Abbeele *et al.*, 2010). In continuous-culture fermenters, adaptation periods of 3-7 d after inoculation have been

established as adequate for achieving steady-state conditions in the fermentation flask, allowing adequate conditions for sampling (Crawford *et al.*, 1980; Miettinen & Setälä, 1989). However, there is little information concerning the transition of microbial populations from rumen to fermenters and during the course of incubation in fermenters (Ziemer *et al.*, 2000; Muetzel *et al.*, 2009). Culture based microbial techniques have been only able to detect a low proportion of microorganisms while molecular techniques based on 16S rDNA provide a closer approximation of the actual microbial populations and diversity of complex ecosystems such as the digestive tract (Zoetendal *et al.*, 2004).

Therefore, the aim of this work was to study the changes in different microbial populations of goats' rumen content during inoculum preparation and incubation of diets differing in forage to concentrate ratio in single-flow continuous-culture fermenters.

MATERIAL AND METHODS

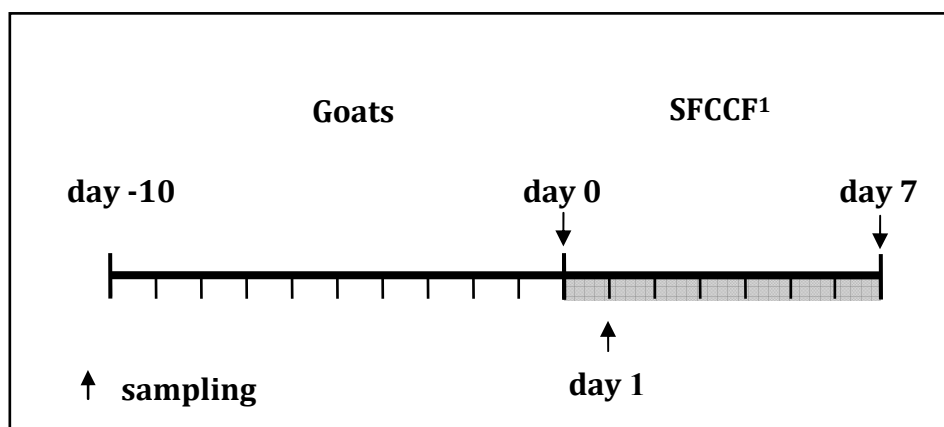
Animals, diets and fermenters

Four adult dry non-pregnant Granadina goats (46.3 ± 2.9 kg BW) with permanent ruminal cannula were used to collect rumen content samples. Animals were kept in individual cages with free access to water. Experimental diets consisted of alfalfa hay and concentrate (**Table 4.2.1**) at two different ratios: 70:30 (LC) and 30:70 (HC). Diets were supplied twice a day (9:00 and 16:00 h) to assure refusals of around 20% above the energy maintenance requirements (Prieto *et al.*, 1990) in order to avoid selection of diet components. Two 10-d trials were carried out following a cross-over design with each diet randomly allocated to two animals in each trial. On day 10 of each trial, immediately before the morning feeding 40 mL and 1 L aliquots of rumen content were collected from each goat through the ruminal fistula. The former were used for DNA extraction after freeze-drying and the latter were strained through 4 layers of cheesecloth within 30 minutes after rumen content collection and the filtrate used as fermenter inoculum (**Figure 4.2.1**).

Table 4.2.1. Chemical composition (g kg⁻¹ dry matter) of alfalfa hay and concentrate.

	Alfalfa hay	Concentrate*
Dry matter, g/kg fresh matter	895	899
g/kg dry matter		
Organic matter	893	905
Crude protein	192	199
Ether extract	14.9	33.1
NDF	428	329
ADF	320	131
ADL	73.0	27.0
Gross energy, MJ/kg dry matter	18.3	18.2

* Ingredient composition of the concentrate (g kg⁻¹ fresh matter): 215 g of barley, 204 g of corn gluten meal, 200 g of wheat bran, 135 g of soybean 44, 115 g of palm meal, 50 g of wheat, 50 g of corn, 10 g of calcium carbonate, 10 g of white salt, 5 g of vitamin-mineral premix, 4 g of calcium soap, 4 g of bicalcium phosphate, 3 g of sodium bicarbonate.

**Figure 4.2.1.** Diagram of the experimental schedule. ¹ SFCCF: Single-flow continuous-culture fermenters.

Four single-flow continuous-culture fermenters (SFCCF) following the model of Miettinen & Setälä (1989) were used. Fermenter characteristics and the general incubation procedure were as described by Molina-Alcaide *et al.* (2009). Two 7-d incubation runs were carried out following a cross-over design with each diet randomly allocated to two 1L-fermenters in each run. Each fermenter was

inoculated with 700 mL of strained rumen content obtained from one goat receiving the same diet fed to the fermenter. All the fermenters received daily 30 g of dry matter (DM) of the corresponding experimental diet in two equal portions at 9:00 and 16:00 h. The CO₂ was continuously supplied to maintain anaerobic conditions in the fermentation flasks. Flow of liquid and particles through the fermenter was maintained by continuous infusion of artificial saliva (McDougall, 1948) at 40 mL h⁻¹. The overflow or effluent from each fermenter was collected into a flask maintained at 3°C in a cold-water bath to avoid microbial growth. One and 7 days after inoculation, 2-mL samples from the fermenter contents were directly collected by using sterile eppendorf tubes and then freeze-dried for DNA extraction.

Animals' management and rumen content sampling were carried out by trained personnel. Animals were cared and handled in accordance with the Spanish guidelines for experimental animal protection (Royal Decree 1201/2005 of October 10 on the protection of animals used for experimentation or other scientific purposes) in line with the European Convention for the Protection of Vertebrates used for Experimental and other Scientific Purposes (European Directive 86/609).

Chemical analyses

Samples of alfalfa hay and concentrate supplied were dried in a forced air oven at 60°C for 48 h and ground through a 1 mm sieve. Dry matter (method ID 934.01), ash (method ID 942.05), ether extract (method ID 7.045) and crude protein (method ID 984.13) in samples were determined according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005). Gross Energy (GE) was measured with an adiabatic calorimeter (Model 1356, Parr Instrument Co., Moline, IL). The NDF, ADF and ADL contents were analyzed according to van Soest *et al.* (1991) using an ANKOM Model 220 Fiber Analyzer (Macedon, NY). The α - amylase enzyme was used for NDF analysis in concentrate, and both NDF and ADF were expressed exclusive of residual ash. The ADL content was determined by solubilization of cellulose in the ADF residue with 72% sulphuric acid (van Soest *et al.*, 1991).

DNA extraction

Freeze-dried samples of rumen and fermenter contents, the latter ones collected on days 1 and 7 after inoculation, were homogenized with steel beads (2.3 mm) in a Mini-Beadbeater-8 (BioSpec Products Inc., Bartlesville, OK) and 30-50 mg were used for the extraction of total DNA following the guidelines of the QIAmp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Two samples corresponding to the first incubation run in fermenters fed diet HC were discarded because of DNA damage.

Real-time PCR

The numbers of total bacteria and relative abundance of *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, total fungi and methanogenic archaea were determined by real-time qPCR (RT-qPCR). Different primer sets (**Table 4.2.2**) were used to amplify the 16S rDNA region targeted for total bacteria (Maeda *et al.*, 2003), *F. succinogenes* and *R. flavefaciens* (Denman & McSweeney, 2006). A specific 18S rRNA gene region was used for total fungi (Denman & McSweeney, 2006). Primers designed for the detection of methanogenic archaea were targeted against the alpha-subunit of methyl coenzyme-M reductase gene (*mcrA*; Denman *et al.*, 2007). An optimization of primers concentration and annealing temperature was previously done. Optimal concentrations of reagents for RT-qPCR assay were 0.4 µM of each primer, 1X iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) containing 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.4 mM each dNTP, 6 mM MgCl₂, 20 nM fluorescein, SYBR Green I, stabilizers and 0.05 U/µL *iTaq* DNA polymerase; and 15-70 ng DNA template in a final volume of 25 µL. Amplification of each target group was carried out with the following program: one cycle at 95°C for 5 min, 40 cycles at 95°C for 15s, 60°C for 30s for annealing, 72°C for 55s for elongation and 75°C for 6s for measuring the fluorescence emission. Each sample was amplified in triplicate in order to reduce the experimental errors. The melting curve was built by measuring the decrease in the fluorescence emissions as a result of increasing the temperature from 55°C to 95°C. Ramps of 0.5°C were set every 10 seconds.

Microbial quantification

Bacterial abundances were expressed as 16S rDNA copies x g⁻¹ fresh matter (rumen content or fermenter content). The calibration curve was obtained by amplifying a serially diluted standard (10-fold) to provide a range of 6 x 10⁸ - 6 x 10⁵ units µL⁻¹. The standard was the plasmid pCR®4-TOPO (Invitrogen™, Carlsbad, CA) with a conserved fragment of the 16S rDNA for total bacteria (Maeda *et al.*, 2003), which was inserted by cloning. The number of plasmid copies in the standard dilutions was determined from the plasmidic DNA concentration and the molecular weight of the recombinant plasmid.

Relative abundances of *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, total fungi and methanogenic archaea were determined by using the ΔC_t method, where the conserved 16S rDNA fragment for total bacteria was used as a 'housekeeping gene' for normalization of data as described by Denman & McSweeney (2005). Data were expressed as $2^{-(C_t \text{ target} - C_t \text{ total bacteria})}$, where C_t is the threshold cycle obtained in each sample amplification for the target group or species and total bacteria group.

Table 4.2.2. PCR primers used for the molecular analyses.

Target group	Technique	Forward sequence	Reverse sequence	Ref.
Bacteria	RT- qPCR	GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA	ACGTCRTCCMCACCTTCCTC	1
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	RT- qPCR	GTTGGGAATTACTGGGGCTAAA (586)*	CGCCTGCCCCCTGAACTATC (706)*	2
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	RT- qPCR	CGAACGGAGATAAATTTGAGTTTACTTAGG (96)*	CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC (220)*	2
Fungi	RT- qPCR	GAGGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGTTTC	CAAATTCACAAAAGGGTAGGATGATT	2
Methanogens	RT- qPCR	TTCGGTGGATCDCARAGRGC	GBARGTCGWAWCCGTAGAAATCC	3
Bacteria	DGGE	P1: CCTACGGGAGGCAGCAG (341)*	P3: ATTACCGGGCTGCTGG (534)*	4
Bacteria	DGGE	P2: CGCCCCCGGGCGGGGGGGGG CGGGGGCACGGGGGGGGCTACGGGAGGCAGCAG (301)*	P3: ATTACCGGGCTGCTGG (534)*	4
Bacteria	T-RFLP	FAM-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (27)*	ACGGGGGGTGTGTACAAG (1389)*	5

* 5' end position in the 16S rDNA of *Escherichia coli*.

1. Maeda *et al.* (2003).
2. Denman & McSweeney (2006).
3. Denman *et al.* (2007).
4. Muyzer *et al.* (1993).
5. Hongoh *et al.* (2003).

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

The variable V3 region of 16S rDNA was amplified by using the primers set (**Table 4.2.2**) described by Muyzer *et al.* (1993) for a nested PCR. The reaction mix for the first amplification consisted of 1X TAE buffer as supplied by the manufacturer, 2 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTPs, 2 μM primers P1 and P3, 1 U *Taq* polymerase (Dominion – MBL, Córdoba, Spain) and 30 - 140 ng of DNA template in a final volume of 25 μL. The second amplification was carried out by using the same reverse primer (P3) and a forward primer with 40 bp-GC clamp (P2) at its 5' end at the position 341. In this reaction, the same concentration of reagents and primers, double amount of DNA template and 2 U *Taq* polymerase were used in a final volume of 50 μL. Cycling conditions were 94°C for 5 min, 33 cycles at 94°C for 15s, 58°C for 15s, 72°C for 30s and one cycle at 72°C for 10 min for a final extension.

The PCR product was loaded in a denaturant polyacrylamide gel (9% acrylamide/bisacrylamide, 45 - 75% urea/formamide, and 0.5X TAE buffer). The polymerization was carried out in an INGENY phorU - 2 x 2 system (Ingeny International BV, Goes, The Netherlands). The electrophoretic separation was performed at 58°C and 200 V during 10 min and 75 V during 16 h. The gel was treated with Bio-Rad Silver Stain Kit (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). A digital image of the gel was used to allocate and align bands with the Quantity One software (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA).

Terminal - Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

Almost the whole 16S rRNA gene (1300 bp) was amplified with the universal primers 27F and 1389R (**Table 4.2.2**) described by Hongoh *et al.* (2003). The amplification mix contained 1X TAE buffer as supplied by the manufacturer, 2 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTPs, 1 mM each primer, 1 U *Taq* polymerase (Dominion – MBL, Córdoba, Spain) and 0.5 μL of DNA template in a final volume of 25 μL. The amplification program was: one 4 min cycle at 94°C, 25 cycles at 94°C, 55°C and 72°C for 1 min each one, one cycle at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 5 min. The PCR products were purified with MBL PCR QuickClean Kit (Dominion –

MBL, Córdoba, Spain) following the guidelines of the manufacturer and digested with the restriction enzymes *CfoI* (*HhaI*), *HaeIII* and *MspI* in 3 different reactions. Twenty ng of amplified DNA were cut by mixing 1X SuRE/Cut Buffer L and 1 U of endonuclease (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in a final volume of 20 μL and incubating at 37°C for 5 h. Afterwards, the reaction was stopped by incubating at 80°C for 20 min. Two μL of digested products were mixed with 0.3 μL of GeneScan-600 LIZ size standard and 12 μL of deionised formamide (Hi-Di Formamide Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). The mix was heated at 90 °C for 2 min and cooled for at least 5 min. The restriction fragments were separated into 50 cm-capillars composed by the POP7 polymer. This capillary electrophoresis was carried out with a 3130xl Genetic Analyzer ABI PRISM (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Fluorescence data were analyzed by using the GeneMapper Software v 4.0 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) and the AFLP method. Peaks under 40 units of fluorescence were deleted. Relative peak heights were used to calculate the distance matrix. Relative heights representing less than 0.5 % were removed from the analysis in order to eliminate peaks representing fluorescent background.

Bacterial diversity calculations

Individual bands in DGGE gels or peaks in T-RFLP electropherograms cannot be always ascribed to a unique sequence or species (Muyzer & Smalla, 1998; Blackwood *et al.*, 2007). However, previous studies have related gel bands with operational taxonomic units (OTUs) to compare microbial profiles of different samples (Fromin *et al.*, 2002). Thus, the presence or absence of bands in DGGE and the number of peaks found in T-RFLP (for each enzyme separately or all together) were analyzed to calculate OTUs richness.

Analysis of T-RFLP data provides information on the relative abundance of each theoretical OTU based on peak heights and, thus, allows for the calculation of diversity and evenness in environmental samples. Bacterial diversity of the experimental samples was estimated by the Shannon index (Wiener, 1948; Shannon & Weaver, 1949):

$H' = - \sum_{i=1}^S (P_i \ln P_i)$, where P_i is the percentage of the individuals belonging to the species i . The Shannon evenness (Magurran, 1988) was calculated following the mathematical expression:

$E = H' (\ln S)^{-1}$, being S the total number of species and H' the previously calculated Shannon index. Both indexes were calculated by either considering each enzyme separately or the three enzymes together.

Clustering and ordination analyses

CAP 4 software (Community Analysis Package, Pisces Conservation Ltd., Lymington, Hampshire, UK) was used to perform some multivariate analyses of DGGE and T-RFLP data. Hierarchical clustering of samples was done by using the average linkage (UPGMA; Sokal y Michener, 1958) clustering method and the 1-Sørensen distance index, which is a non-metric index based on Sørensen's similarity coefficient (Sørensen, 1948). Non metric multidimensional scaling (NM-MDS) analysis was used to confirm whether main factors in this experiment, diet and sampling day, determined differences or not on the bacterial community structure.

Assignment of bacterial phlotypes

To identify bacterial populations whose abundances changed as a consequence of the manipulation of rumen content to prepare fermenter inoculum or the *in vitro* incubation, the assignment of certain combination of terminal restriction fragments (T-RFs) was carried out. T-RFLP Phylogenetic Assignment Tool software (PAT; Kent *et al.*, 2003) along with a T-RFs database were used to conduct the assignment of phlotypes. The T-RFs database was generated by *in silico* restriction of a collection of 16S rDNA bacterial fragments (Ribosomal Database Project, Cole *et al.*, 2009) with the Virtual Digest tool (ISPaR) of MiCA 3 website (Shyu *et al.*, 2007). Since it has been reported that *HhaI* digestion might distinguish bacterial populations better than *HaeIII* and *MspI* digestions (Belenguer *et al.*,

2010), selection of T-RF combinations was carried out taking into account the *HhaI* T-RFs abundance in the samples. Selected *HhaI* fragments were those being different in rumen contents than in fermenter contents.

Statistical analyses

To investigate the effect of diet, and rumen content manipulation and its *in vitro* incubation on the microbial abundances and bacterial diversity, data were analyzed by a 2-ways ANOVA with SPSS software (IBM SPSS Statistics v.19, IBM Corp., Somers, NY) using the GLM procedure. The model included sample type, diet, and sample type x diet interaction. Differences among treatments were declared at $P \leq 0.05$. Bonferroni test was used to state mean differences.

To check whether the hypothetical groups defined by the experimental variables (diet and sample type) fit into the clustering patterns obtained from the multivariate analyses of DGGE and T-RFLP data, an analysis of similarities (ANOSIM) was performed by using CAP 4 software (Pisces Conservation Ltd., Lymington, Hampshire, UK). Pairwise similarities were carried out between both experimental diets and among sampling days, considering fermenter content samples both separately or all together.

RESULTS

Microbial numbers

As shown in **Table 4.2.3**, 16S rDNA copies were lower ($P < 0.001$) in fermenter contents than in the goats' rumen. However, 16S copies did not vary ($P = 0.336$) 7 d after inoculation of fermenters. The relative abundances of *F. succinogenes* ($P = 0.003$), total fungi ($P < 0.001$) and total methanogenic archaea ($P < 0.001$) were lower in the fermenter contents sampled one day after inoculation compared to the rumen. Values in the fermenter contents did not change ($P \geq 0.05$) after 7 days of incubation. The relative abundance of *R. flavefaciens* was not different ($P = 0.212$) for the rumen and fermenter contents independently of the sampling day. The type of diet affected ($P = 0.016$) 16S rDNA copies only in rumen but not in

fermenters ($P = 0.262$), the highest values being for the diet HC, while the relative abundances of methanogens, cellulolytics species and fungi were not affected ($P \geq 0.804$) by the diet either in rumen or fermenter contents.

Bacterial community diversity

Information about bacterial OTUs richness, diversity and evenness appears in **Table 4.2.4**. DGGE data showed data that there were not differences in bacterial richness ($P = 0.273$) between diets. The number of OTUs were apparently higher in fermenters than in rumen contents (58.6 vs 41.6, respectively), although differences were not significant ($P = 0.292$). T-RFLP data did not show any effect ($P > 0.219$) of the sampling day or diet on OTUs richness outlined by the different enzymes separately or all together. Total amount of T-RFs obtained from each enzyme differed (110, 99 and 142 for *HhaI*, *HaeIII* and *MspI*, respectively, data not shown), due to the different number of restriction target sites. Average numbers of peaks in all samples were 20.6, 23.4 and 30.5 for *HhaI*, *HaeIII* and *MspI*, respectively. The Shannon index and evenness, calculated for results obtained by using endonucleases *HhaI*, *MspI* or the 3 enzymes considered all together, were not affected either by the sampling day ($P > 0.192$) or the diet ($P > 0.232$). However, an effect of the sampling day on the Shannon index ($P < 0.001$), and of the diet ($P < 0.001$) and sampling day ($P = 0.035$) on the Shannon evenness, both calculated from *HaeIII* peaks profile, were observed.

Table 4.2.3. Absolute abundances of total bacteria and relative abundances of *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, total fungi and methanogenic archaea in the rumen of goats and in single-flow continuous-culture fermenters one and seven days after inoculation.

	Sample			Diet ¹			P-value		
	Rumen content	Fermenter content 1*	Fermenter content 7*	LC	HC	SEM ²	Sample	Diet	Sample x Diet
Bacteria, (16S rDNA copies x 10 ¹⁰) x g ⁻¹ fresh matter	3.24 ^b	1.06 ^a	1.31 ^a	1.54	2.40	0.104	<0.001	0.005	0.009
Relative abundances, 2 ⁻ (Ct target-Ct total bacteria) x 10 ⁻²									
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	4.08 ^b	1.49 ^a	1.29 ^a	2.36	2.38	0.3258	0.003	0.804	0.844
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	0.348	0.111	0.133	0.195	0.215	0.0614	0.212	0.996	0.742
Fungi	0.394 ^b	0.029 ^a	0.044 ^a	0.156	0.179	0.0322	<0.001	0.967	0.954
Methanogens	1.71 ^b	0.577 ^a	0.473 ^a	0.909	1.01	0.0807	<0.001	0.839	0.569

* 1 and 7 days after inoculation.

¹ LC: 70% alfalfa hay and 30% concentrate; HC: 30% alfalfa hay and 70% concentrate, dry matter basis.

² SEM: standard error of the mean, n = 22.

^{a, b} Within a row sampling day means without a common superscript letter differ, P < 0.05

Table 4.2.4. Bacterial OTUs richness, diversity (Shannon index) and Shannon evenness in the rumen of goats and in single-flow continuous-culture fermenters one and seven days after inoculation.

	Sample		Diet ¹		P-value				
	Rumen content	Fermenter content 1*	Fermenter content 7*	LC	HC	SEM ²	Sample	Diet	Sample x Diet
DGGE									
Bacterial OTUs	41.6	56.1	61.0	57.6	46.2	4.88	0.292	0.273	0.663
T-RFLP									
Bacterial OTUs									
<i>Hhal</i>	21.0	22.9	18.0	20.8	20.5	1.22	0.279	0.982	0.166
<i>HaeIII</i>	25.9	21.6	22.6	22.8	24.2	1.00	0.219	0.573	0.511
<i>MspI</i>	27.8	35.6	28.1	29.3	31.6	2.52	0.351	0.573	0.694
<i>Hhal</i> + <i>HaeIII</i> + <i>MspI</i>	74.7	80.1	68.7	72.9	76.3	3.32	0.369	0.545	0.336
Shannon index									
<i>Hhal</i>	2.44	2.26	2.21	2.30	2.32	0.076	0.473	0.890	0.176
<i>HaeIII</i>	2.81 ^b	2.27 ^a	2.38 ^a	2.53	2.46	0.045	<0.001	0.297	0.085
<i>MspI</i>	2.24	2.55	2.45	2.34	2.49	0.089	0.307	0.320	0.769
<i>Hhal</i> + <i>HaeIII</i> + <i>MspI</i>	2.50	2.36	2.35	2.39	2.43	0.041	0.286	0.665	0.112
Shannon evenness									
<i>Hhal</i>	0.810	0.725	0.781	0.770	0.778	0.020	0.249	0.866	0.638
<i>HaeIII</i>	0.865 ^b	0.743 ^a	0.768 ^a	0.814	0.774	0.010	<0.001	0.035	0.155
<i>MspI</i>	0.710	0.720	0.741	0.698	0.754	0.022	0.837	0.232	0.674
<i>Hhal</i> + <i>HaeIII</i> + <i>MspI</i>	0.582	0.540	0.558	0.559	0.563	0.009	0.192	0.866	0.336

* 1 and 7 days after inoculation. ¹ LC: 70% alfalfa hay and 30% concentrate; HC: 30% alfalfa hay and 70% concentrate, dry matter basis. ² SEM: standard error of the mean, n = 22.

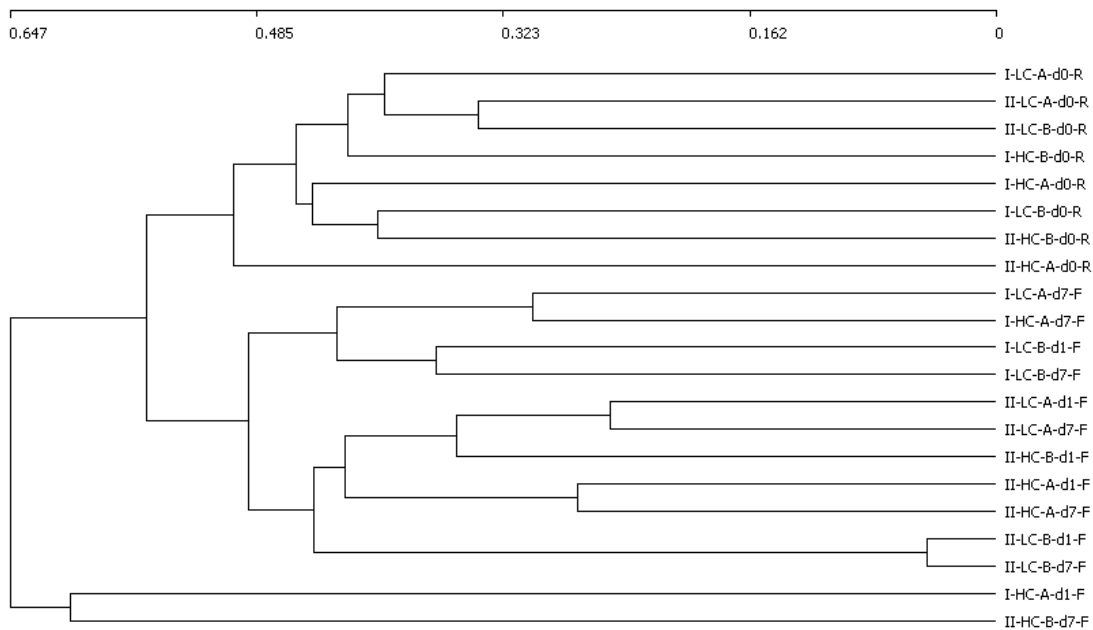
^{a, b} Within a row sampling day means without a common superscript letter differ, P < 0.05.

Bacterial community structure

Rumen content samples grouped separately from most of the fermenter content samples in the dendrogram provided by DGGE banding analysis (**Figure 4.2.2. A**). The dendrogram built from T-RFLP data (**Figure 4.2.2. B**) showed three clusters in which rumen content grouped separately from fermenter content sample. Both in DGGE and T-RFLP dendrograms, there was not a grouping pattern for fermenter content samples from days 1 and 7 after inoculation.

NM-MDS plots (**Figure 4.2.3**) and ANOSIM (**Table 4.2.5**) showed, both in DGGE and T-RFLP, no effect of the diet on the bacterial community structure. Although for both fingerprinting techniques there was a segregation of rumen contents from fermenter contents, there was no separation which could be ascribed to the sampling day in fermenters. ANOSIM showed a clearer effect of the sampling day on the clustering pattern for DGGE (R statistics = 0.496 and P = 0.001) than for T-RFLP (R statistic = 0.265 and P = 0.001, considering 3 groups of samples) dendrogram.

A)



B)

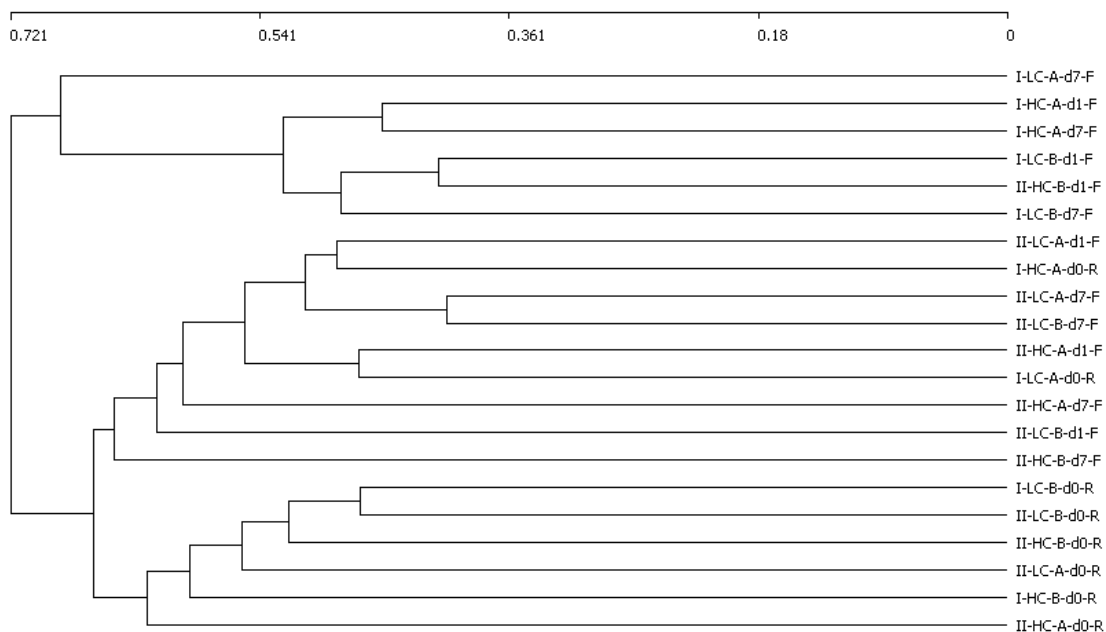
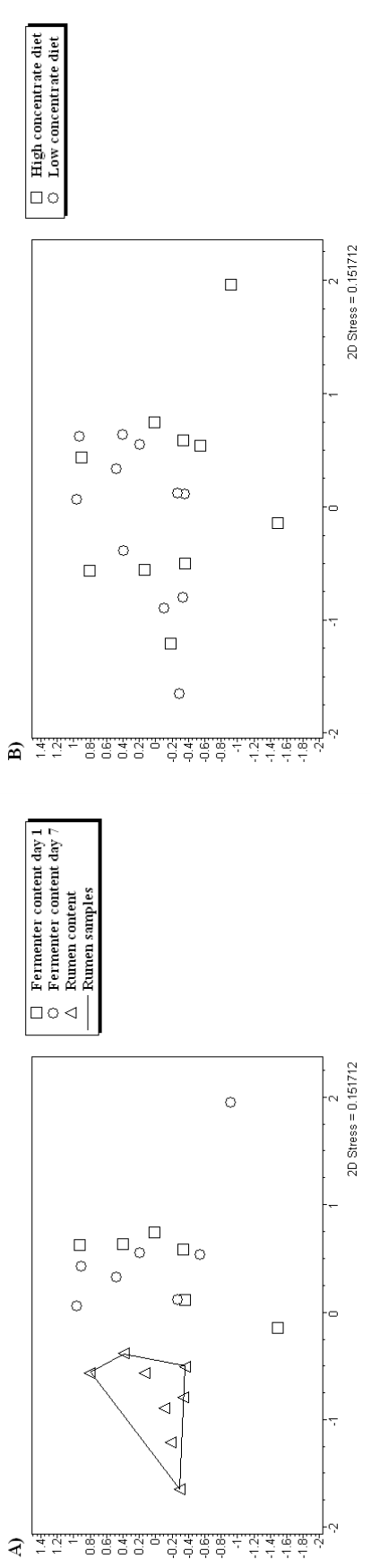


Figure 4.2.2. Dendrograms from A) DGGE and B) T-RF profiles of the goats' rumen and fermenters. Average linkage analysis and 1- Sørensen distance were used. LC: 70% alfalfa hay and 30% concentrate; HC: 30% alfalfa hay and 70% concentrate (dry matter basis). Samples nomenclature: I-LC-A/B-d0/1/7-F/R (period - diet - replicate - sampling day - fermenter/rumen). Sample I-LC-A-d1-F was rejected for both analyses for aberrant results.

I) DGGE



II) T-RFLP

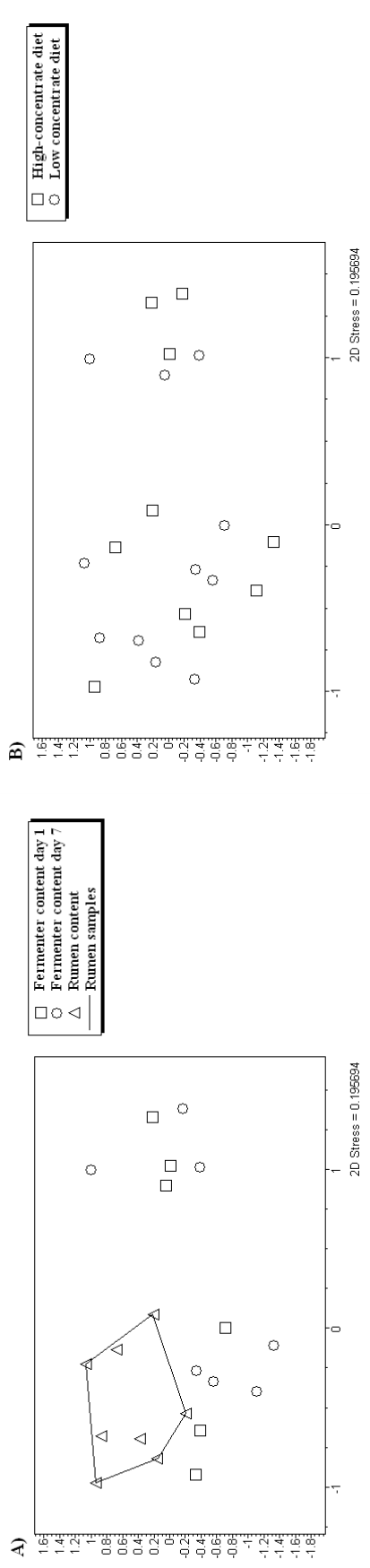


Figure 4.2.3. Multi-dimensional scaling plots of the A) sampling day and B) diet from I) DGGE and II) T-RFLP analyses. All the plots were built by using the Sørensen similarity index.

Table 4.2.5. Analysis of similarities (ANOSIM) for groups based on the type of sample (rumen or fermenter content) and the type of diet (LC and HC).

	DGGE		T-RFLP	
	R statistic	P-value	R statistic	P-value
Type of sample				
RC ¹ -FC ²	0.496	0.001	0.142	0.196
RC-FC1 ³ -FC7 ⁴	0.379	0.001	0.265	0.001
Diet				
LC ⁵ -HC ⁶	0.011	0.235	0.007	0.278

¹ RC: Rumen content.

² FC: Fermenter content.

³ FC1: Fermenter content day 1.

⁴ FC7: Fermenter content day 7.

⁵ LC: 70% alfalfa hay and 30% concentrate diet, dry matter basis.

⁶ HC: 30% alfalfa hay and 70% concentrate diet, dry matter basis.

Assignment of bacterial phylotypes

The most relevant combinations of T-RFs generated in the T-RFLP profiles obtained with the three enzymes are shown in **Table 4.2.6**. The selection of these peaks has been based on the predominance in three different scenarios: high predominance in rumen contents, high predominance in fermenter contents 1 and 7 days after inoculation and high predominance in rumen and in fermenter contents 1 day after inoculation. Potential compatible bacterial species with these T-RFs is also shown in **Table 4.2.6**. Bacteria from the genus *Acinetobacter* and from the order *Clostridiales* showed high abundance only in rumen contents while *Bacteroidetes*-compatible fragments were also in high abundance in fermenter contents taken one day after inoculation but disappeared in samples taken 7 days after inoculation. On the other hand, there were two groups of fragments belonging to the family *Acidaminococcaceae* and the genus *Megamonas* that only showed remarkable abundance in samples collected from fermenters both at days 1 and 7 after inoculation.

Table 4.2.6. Predominant *Hhal* peaks in the different samples (rumen and fermenter contents) and assignment of compatible bacteria.

<i>Hhal</i> T-RF (bp)	<i>Hae</i> III T-RF (bp)	<i>Msp</i> I T-RF (bp)	Compatible bacteria	Type of sample in which <i>Hhal</i> T-RF is predominant
91	254	492	Genus <i>Acinetobacter</i>	Rumen content
561	271	220	Order <i>Clostridiales</i>	Rumen content
22	190	25	Family <i>Acidaminococcaceae</i>	Fermenter contents days 1 and 7
28	205	294	Genus <i>Megamonas</i>	Fermenter contents days 1 and 7
90	252	85	Order <i>Bacteroidales</i>	Rumen content and fermenter contents day 1
96	259	80	Genus <i>Parabacteroides</i>	Rumen content and fermenter contents day 1
375	261	145	Class <i>Gammaproteobacteria</i>	Rumen content and fermenter contents day 1

DISCUSSION

Microbial numbers

The selection of microbial groups for quantification by RT-qPCR was based on their role in key ruminal metabolic pathways. *F. succinogenes* and *R. flavefaciens* are the predominant cellulolytic bacteria in the rumen (Koike & Kobayashi, 2001) and fungi are relevant in fiber degradation and lignin solubilization (Mountfort, 1987). Methanogenic archaea are involved in the synthesis of methane, which is responsible for a loss of 2 - 12% of the gross dietary energy (Czerkawski, 1969). In addition, enteric methane emissions represent 15 % of the anthropogenic methane emissions worldwide (Gill *et al.*, 2010).

A decrease of 67% in the number of total bacteria was observed when rumen and fermenter contents taken one day after inoculation were compared. This may be due to the loss of solid-associated bacteria as a consequence of the rumen content filtration, which is a common practice to prepare inocula for *in vitro* rumen simulation techniques (Kajikawa *et al.*, 2003). In addition, filtration involves the exposure to oxygen that may be responsible for the loss of most strict anaerobic bacteria (Gizzi *et al.*, 1998). Our results agree with those found in other studies (Prevot *et al.*, 1994; Muetzel *et al.*, 2009) reporting lower bacterial biomass in semi-continuous and continuous fermenters, during the adaptation phase, compared with the rumen. The other microorganisms studied also showed lower abundances in the fermenter contents sampled 1 day after inoculation than in the rumen. Most of the rumen microbiota is attached to particles of digesta (Cheng *et al.*, 1995), especially microorganisms involved in fiber degradation. In the present study, higher abundance of *F. succinogenes* than *R. flavefaciens* was detected both in rumen and in fermenters. *F. succinogenes* can colonize fiber more extensively than *R. flavefaciens* because the former can attach and grow not only in damaged parts of fiber but also in undamaged and inner structures (Latham *et al.*, 1978; Shinkai & Kobayashi, 2007). Thus, most studies have reported higher densities of *F. succinogenes* than *R. flavefaciens* in the rumen (Kobayashi *et al.*, 2007). *R. flavefaciens* abundances were similar in the rumen and fermenter contents. Some authors have pointed out that *R. flavefaciens* shows a preferential colonization of leaf sheath surfaces, which are more easily degradable, rather than stems (Shinkai

& Kobayashi, 2007). The forage used in this experiment, rich in stems, might explain the low proportion of *R. flavefaciens* cells attached to the rumen content solids and hence discarded after filtration. In agreement with our findings, other authors (Mansfield *et al.*, 1995; Ziemer *et al.*, 2000; Muetzel *et al.*, 2009) found greater abundances of some cellulolytic bacteria in the rumen than in fermenter contents. This, together with the important decrease of fungi in the fermenters could point to the limited ability of SFCCF to simulate the rumen environment when diets rich in structural carbohydrates are used (Carro *et al.*, 2009). Indeed, the forage:concentrate ratio affected bacterial abundances in the rumen but not in fermenters, greater number of 16S rDNA copies found in the animals fed HC diet compared to those receiving LC diet.

The lack of variation in all the considered microbial abundances, when fermenter contents from days 1 and 7 after inoculation were compared, suggests a rather stable situation in terms of microbial numbers under *in vitro* conditions. However, Ziemer *et al.* (2000) observed increased amount of bacterial rRNA after 10 d incubation in dual-flow fermenters. This might be due to lower dilution rates of liquid and solids (0.10 h^{-1} and 0.055 h^{-1} , respectively) in the dual flow system in comparison to single flow fermenters. A drastic drop of protozoa in SFCCF over the first 7 days after inoculation has been previously reported (Moumen *et al.*, 2009), but, in the present study, protozoa decline did not seem to affect the numbers of total bacteria as suggested *in vivo* (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2007). Our findings are in accordance with Ziemer *et al.* (2000) in terms of *Fibrobacter* and Archaea populations, whose absolute abundances did not vary throughout 10d of incubation in fermenters.

Bacterial diversity and structure

Overall, both bacterial OTUs richness and the Shannon diversity index showed no differences among goats' rumen and fermenter contents over the first 7 days of diet incubation. There was, however, a significant reduction of bacterial diversity after the inoculation of rumen fluid in SFCCF when *HaeIII* was used in the T-RFLP analysis. This could be due to the previously discussed loss of some bacterial

groups by the filtration of rumen content and the exposure to oxygen, which might have only picked by the restriction sites of this enzyme. This is supported by a recent molecular profiling study of the rumen bacterial community fractionated in planktonic, loosely- and tightly-attached to particles bacteria, which showed that the latter is rather more diverse than the planktonic and loosely-attached consortia (Kong *et al.*, 2010). These authors showed that, in ruminants fed alfalfa hay, solid-attached bacterial consortium is 1.9 times more diverse than the planktonic populations. To our knowledge there is no literature studying the differences in bacterial diversity between the rumen content and SFCCF contents. Our results show that SFCCF are able of maintaining a bacterial community with a similar diversity as the one residing in the rumen of goats for at least as long as 7 days of diet incubation.

Although both DGGE and T-RFLP are well accepted fingerprinting techniques for the study of complex microbial ecosystems, it has been reported that T-RFLP gives better resolution in detecting species than DGGE (Moeseneder *et al.*, 1999). Thus in this study, T-RFLP was also used to obtain more detailed and complementary information concerning bacterial community structure than that provided by DGGE. The analysis of the DGGE pattern displayed a clear segregation between bacterial community in rumen contents and that established in the fermenters after inoculation. Likewise, the dendrogram obtained from the T-RFLP pattern analysis showed a separation between samples from the rumen and from fermenters, although not so clear as shown by DGGE analysis. Considering that there was only one day difference between the collection of rumen contents and of fermenter contents at day 1, we hypothesize that the loss of bacterial groups in the solid fraction which is discarded after filtration explains the differential clustering displayed both in DGGE and T-RFLP analyses. Indeed, it has been recently estimated, using 16S rDNA clone library analyses, that bacterial populations residing in the solid associated and liquid fraction share only 12 % of species (Kong *et al.*, 2010), which is even lower than the average similarity in species between individual animals (22%).

In both fingerprinting analyses (DGGE and T-RFLP), the clustering pattern did not show an effect of the *in vitro* conditions after seven days of incubation in

fermenters, which suggests that the transition from *in vivo* to *in vitro* is the main factor affecting the bacterial community structure, as the populations remain reasonably stable over the course of a week once processed and inoculated in the fermentation flask. The time needed for the microbial ecosystem to adapt to the *in vitro* conditions may vary according to the complexity of the simulating system used and may go up to 2 weeks (van den Abbeele *et al.*, 2010).

The clustering analysis derived from both DGGE and T-RFLP showed no effect of the concentrate to forage ratio in the diet on the bacterial structure. This was further confirmed by the NM-MDS analysis in which no special segregation of samples depending on diet was observed. This lack of effect of dietary treatment is probably due to the use of a fiber-rich concentrate. The pH in the fermenters has been thought to be responsible for significant shifts in the rumen bacterial populations (Calsamiglia *et al.*, 2008; Carro *et al.*, 2009) but, in our experiment, the increase in the proportion of concentrate determined no changes in pH values (6.53-6.31 for LC and HC diets, respectively). In addition, it is known that forage in the diet is the main factor that drives the whole bacterial community structure (Kong *et al.*, 2010). This is explained not only by the chemical composition of the forage but also by the complexity of its structure, which in turn will determine the formation of different bio-films and microbial consortia (Koike *et al.*, 2003).

Assignment of bacterial phylotypes

The predominant *HhaI* T-RF observed in rumen contents belong to the genus *Acinetobacter*. There was another fragment corresponding to the class *Gammaproteobacteria* that was remarkably abundant in rumen samples and in fermenter contents after inoculation but disappeared after 7 days of incubation in the *in vitro* environment. One of the main differences between the rumen and the fermenter is the lack, in the latter, of an epithelium which absorbs and protects. Recently published data report that the bacterial consortium attached to the rumen epithelium is different to the consortia found in the rumen content (Cho *et al.*, 2006; Sadet *et al.*, 2007). Differences reflect a consistently higher proportion of *Proteobacteria* in the rumen epithelium-associated consortium (13%, Sadet-

Bourgeteau *et al.*, 2010) than in the rumen content consortia (4%, Yu *et al.*, 2006). It is very likely that a low proportion of the rumen wall associated bacteria are collected through the cannula and if recovered they might find difficult to growth in *in vitro* conditions, where the specific epithelium biofilm environment does not exist. Conversely to *Proteobacteria* compatible fragments, other peaks which might correspond to bacteria belonging to the family *Acidaminococcaceae* and genus *Megamonas* showed a significantly higher predominance only in samples collected from fermenters. Within the family *Acidaminococcaceae* some of the bacteria have been shown to be less sensitive to the exposure to oxygen (i.e. *Megasphaera*, *Selenomonas*, *Veillonella*; Loesche, 1969) which, as mentioned previously, is always an issue during rumen contents sampling and processing. The effect of the exposure to oxygen during inoculum preparation and inoculation may have promoted a physiological advantage to these microbial groups in comparison to those more sensitive to oxygen. In addition, the rapid decrease of holotrichs in single-flow continuous-culture fermenters (Moumen *et al.*, 2009) and the function they play in oxygen consumption in the rumen (Williams, 1986) might have affected the growth of high oxygen sensitive bacteria.

Conclusions

Bacterial community structure and the numbers of some key microbial groups in the rumen content are affected by its processing to prepare fermenter inoculum. There was a decrease in some populations' density and a change in bacterial structure, which could be associated to a different sensitivity to the presence of oxygen and the lack of fermentation products' absorption in fermenters. Rumen microbial community adapts very quickly to the fermenter conditions, which could help to shorten the length of the period needed for achieving the steady-state.

Acknowledgments

This research was supported by the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) of Spain (projects AGL2004- 04755-C02-02 and PIE 200740I021). E. C. Soto gratefully acknowledges support from CSIC for I3P grant. Thanks to J. Fernández, V. Toledano and I. Jiménez for technical assistance.

REFERENCES

- AOAC INTERNATIONAL (2005) *Official Methods of Analysis 18th ed.* Assoc. Off. Anal. Chem., Gaithersburg, MD.
- Blackwood CB, Hudleston D, Zak, DR & Buyer, JS (2007) Interpreting ecological diversity indices applied to terminal restriction fragment length polymorphism data: insights from simulated microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **73**:5276-5283.
- Belenguer A, Hervás G, Yáñez-Ruiz DR, Toral PG, Ezquerro C & Frutos P (2010) Preliminary study of the changes in rumen bacterial populations from cattle intoxicated with young oak (*Quercus pyrenaica*) leaves. *Anim Prod Sci* **50**: 228-234.
- Calsamiglia S, Cardozo PW, Ferret A & Bach A (2008) Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *J Anim Sci* **86**: 702-711.
- Carro MD, Ranilla MJ, Martín-García AI & Molina-Alcaide E (2009) Comparison of microbial fermentation of high-and low-forage diets in sheep rumen, Rusitec and single-flow continuous-culture fermenters. *Animal* **3-4**: 527-534.
- Castillejos L, Calsamiglia S, Ferret A & Losa R (2007) Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim Feed Sci Technol* **132**: 186-201.
- Cheng KJ, McAllister TA & Costerton JW (1995) Biofilms of the ruminant digestive tract. *Microbial Biofilms* (Lappin-Scott HM & Costerton JW, eds), pp 221-232. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Cho SJ, Cho KM, Shin EC *et al.* (2006) 16S rDNA analysis of bacterial diversity in three fractions of cow rumen. *J Microbiol Biotechnol* **16**: 92-101.

- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T & Garrity GM (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* **37**: D141-D145.
- Crawford Jr. RJ, Hoover WH, Knowlton PH (1980) Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. I. Dry matter and fiber digestion, VFA production and protozoa numbers. *J Anim Sci* **51**: 975-985.
- Czerkawski JW (1969) Methane production in ruminants and its significance. *World Rev Nutr Diet* **11**: 240-282.
- Denman SE & McSweeney CS (2005) Quantitative (real-time) PCR. *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants* (Makkar HPS & McSweeney CS, eds), pp. 105-115. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Denman SE & McSweeney CS (2006) Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol Ecol* **58**: 572-582.
- Denman SE, Tomkins NW & McSweeney CS (2007) Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol Ecol* **62**: 313-322.
- Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teyssier-Cuvelle S, Gillet F, Aragno M & Rossi P (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol* **4**: 634-643.
- Gill M, Smith P & Wilkinson JM (2010) Mitigating climate change: the role of domestic livestock. *Animal* **4**: 323-333.
- Giraldo LA, Ranilla MJ, Tejido ML & Carro MD (2007) Influence of exogenous fibrolytic enzymes and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters. *Br J Nutr* **98**: 753-761.
- Gizzi G, Zanchi R & Sciaraffia F (1998) Comparison of microbiological and fermentation parameters obtained with an improved rumen *in vitro* technique with those obtained *in vivo*. *Anim Feed Sci Technol* **73**: 291-305.
- Hongoh Y, Yuzawa H, Ohkuma M & Kudo T (2003) Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiol Lett* **221**: 299-304.

- Kajikawa H, Jin H, Terada F, Suga T (2003) Operation and characteristics of newly improved and marketable artificial rumen (Rusitec). *Mem Natl Inst Livest Grassl Sci* **2**: 1-21.
- Kent AD, Smith DJ, Benson BJ & Triplett EW (2003) Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6768-6776.
- Kobayashi Y, Shinkai T & Koike S (2008) Ecological and physiological characterization shows that *Fibrobacter succinogenes* is important in rumen fiber digestion — Review. *Folia Microbiologica* **53**: 195-200.
- Koike S & Kobayashi Y (2001) Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol Lett* **204**: 361-366.
- Koike S, Yoshitani S, Kobayashi Y & Tanaka K (2003) Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **229**: 23-30.
- Kong Y, Teather R & Forster R (2010) Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS Microbiol Ecol* **74**: 612-622.
- Latham MJ, Brooker BE, Pettipher GL & Harris PJ (1978) Adhesion of *Bacteroides succinogenes* in pure culture and in the presence of *Ruminococcus flavefaciens* to cell walls in leaves of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Appl Environ Microbiol* **35**: 1166-1173.
- Loesche WJ (1969) Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. *Appl Microbiol* **18**: 723-727.
- Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Koikeguchi S, Petelin M, Arai H, Tanimoto I, Nishimura F & Takashiba S (2003) Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immuno. Med Microbiol* **39**: 81-86.
- Magurran AE (1988) *Ecological Diversity and Its Measurement*. Chapman and Hall, London, UK.

- Mansfield HR, Endres MI & Stern MD (1995) Comparison of microbial fermentation in the rumen of dairy cows and dual flow continuous culture. *Anim Feed Sci Technol* **55**: 47-66.
- McDougall EI (1948) Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem J* **43**: 99-109.
- Miettinen H & Setälä J (1989) Design and development of a continuous culture system for studying rumen fermentation. *J Agr Sci Finland* **61**: 463-473.
- Moeseneder MM, Arrieta JM, Muyzer G, Winter C & Herndl GJ (1999) Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3518-3525.
- Molina-Alcaide E, Pascual MR, Cantalapiedra-Hijar G, Morales-García EY & Martín-García AI (2009) Effects of concentrate replacement by feed blocks on ruminal fermentation and microbial growth in goats and single-flow continuous-culture fermenters. *J Anim Sci* **87**: 1321-1333.
- Moumen A, Yáñez-Ruiz DR, Carro MD & Molina-Alcaide E (2009) Protozoa evolution in single-flow continuous culture and Rusitec fermenters fed high-forage diets. *Options Méditerranéennes* **85**: 303-308.
- Mountfort DO (1987) The rumen anaerobic fungi. *FEMS Microbiol Lett* **46**: 401-408.
- Muetzel S, Lawrence P, Hoffmann EM & Becker K (2009) Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. *Anim Feed Sci Technol* **151**: 32-43.
- Muyzer G, de Waal EC & Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**: 695-700.
- Muyzer G & Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 127-141.
- Prevot S, Senaud J, Bohatier J & Prensier G (1994) Variation in the composition of the ruminal bacterial microflora during the adaptation phase in an artificial fermentor (Rusitec). *Zool Sci* **11**: 871-871.
- Prieto C, Aguilera JF, Lara L & Fonollá J (1990) Protein and energy requirements for maintenance of indigenous Granadina goats. *Br J Nutr* **63**: 155-163.

- Sadet S, Martin C, Meunier B & Morgavi DP (2007) PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* **1**: 939-944.
- Sadet-Bourgeteau S, Martin C & Morgavi DP (2010) Bacterial diversity dynamics in rumen epithelium of wethers fed forage and mixed concentrate forage diets. *Vet Microbiol* **146**: 98-104.
- Shannon CE & Weaver W (1949) *The mathematical theory of information*. University of Illinois Press, Urbana, IL.
- Shinkai T & Kobayashi Y (2007) Localization of ruminal cellulolytic bacteria on plant fibrous materials as determined by fluorescence *in situ* hybridization and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* **73**: 1646-1652.
- Shyu C, Soule T, Bent SJ, Foster JA & Forney LJ (2007) MiCA: A web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes. *Microb Ecol* **53**: 562-570.
- Sokal R & Michener C (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ Kansas Sci Bull* **38**: 1409-1438.
- Sørensen T (1948) A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish Commons. *Biol Skr* **5**: 1-34.
- van den Abbeele P, Grootaert C, Marzorati M *et al.* (2010) Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon-region specific and selects for *Bacteroidetes* and *Clostridium* Cluster IX. *Appl Environ Microbiol* **76**: 5237-5246.
- van Soest PJ, Robertson JB & Lewis B (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* **74**: 3583-3597.
- Wiener N (1948) *Cybernetics or Communication and Control in the Animal and the Machine*. John Wiley and Sons, New York.
- Williams A (1986) Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiol Mol Biol R* **50**: 25-49.
- Yáñez-Ruiz DR, Williams S & J. Newbold C (2007) The effect of absence of protozoa on rumen biohydrogenation and the fatty acid composition of lamb muscle. *Br J Nutr* **97**: 938-948.

Yu Z, Yu M & Morrison M (2006) Improved serial analysis of V1 ribosomal sequence tags (SARST V1) provides a rapid, comprehensive, sequence based characterization of bacterial diversity and community composition. *Environ Microbiol* **8**: 603-611.

Ziemer CJ, Sharp R, Stern MD, Cotta MA, Whitehead TR & Stahl DA (2000) Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S ribosomal RNA-targeted probes. *Environ Microbiol* **2**: 632-643.

Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI & Gaskins HR (2004) Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr* **134**: 465-472.

Publicación 3

Ruminal microorganisms developing in different *in vitro* simulation systems inoculated with goats' rumen liquor

Soto E. C., E. Molina-Alcaide, H. Khelil, D. R. Yáñez-Ruiz

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

(Enviado a Animal Feed Science and Technology)

Abstract. This study was conducted to investigate the changes in ruminal microbiota as a consequence of the incubation of rumen fluid in three different *in vitro* simulation techniques (ANKOM Daisy^{II} incubator, batch cultures of mixed rumen microorganisms and single-flow continuous-culture fermenters). In the Daisy^{II} system, several feedstuffs were incubated in two-stages to determine their *in vitro* digestibilities. In batch cultures of mixed rumen microorganisms (BCMRM) two consecutive incubation runs were carried out with a control diet (CO) and 9 experimental diets in which 20, 60 or 100% of barley grain present in CO diet was replaced with tomato, cucumber or a 1:1 mixture of tomato and cucumber, which were wastes from greenhouse horticulture. In single-flow continuous-cultures fermenters (SFCCF), two consecutive incubation runs were carried out only with diets CO and three experimental diets (those including the highest amounts of tomato, cucumber and the mixture of both). Samples from the Daisy^{II} incubator after 48 h of incubation, from BCMRM after 24 and 72 h of incubation and from SFCCF after 4 and 5 d of incubation were taken for DNA extraction. Samples of original inocula used in each *in vitro* system were also used for DNA extraction. Total bacteria, fungi, methanogens and protozoa, and cellulolytic bacteria (*Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus flavefaciens*) were quantified by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and bacterial diversity and structure were analyzed by T-RFLP.

In the Daisy^{II} incubator total bacteria and fibrolytic microorganisms (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, and fungi) declined after 48 hours of incubation; methanogens and protozoa increased or did not change, respectively. In BCMRM, fibrolytic species increased after 24 h incubation while total bacteria, methanogens and protozoa did not change. After 72 h of incubation all the considered microorganisms declined. In SFCCF total bacteria did not change, methanogens and protozoa declined and fibrolytic populations increased after 4 days of incubation. Fibrolytic microbes were lower in effluents at day 5 than at the day 4 of incubation. Bacterial diversity was lower in the buffered rumen liquor incubated for 48 h in the Daisy^{II} system and in BCMRM, after 24 hours. In SFCCF there were not differences in bacterial diversity between the inoculum and fermenter contents 4 d after inoculation. Bacterial species of the inocula were reduced in the Daisy^{II}

incubator after 48 h of incubation and in BCMRM after 24 h, but there were slight differences between the bacterial community composition in the inoculum and that in fermenter contents 4 d after incubation. Effluents and fermenter contents' bacterial structure showed few differences as well. The results of our study show that BCMRM can sustain abundances of the main microbial groups after 24 h incubation very similar to those found in the liquid fraction of the rumen content, although bacterial diversity and composition were severely reduced in this *in vitro* system. SFCCF can maintain abundances of total bacteria and fungi and bacteria diversity and structure similar to those in the inoculum. Effluents and fermenter contents showed very similar microbial abundances, with the exception of fibrolytic populations, and bacterial diversity, which support the use of effluents for analyzing some fermentation parameters.

Keywords: Bacterial diversity; *In vitro* simulation systems; Ruminal microbiota; RT-qPCR; T-RFLP.

INTRODUCTION

Since decades, ruminant nutrition studies rely in some degree on different *in vitro* techniques which have been developed to investigate degradability, digestibility and rumen fermentation. *In vitro* systems allow for more controlled conditions and require fewer animals than *in vivo* experiments, reducing therefore the economical and management costs (López, 2005).

Several *in vitro* methods have evolved over the years for estimating the digestibility of ruminants' feedstuffs but the two-stage method described by Tilley and Terry (1963) is still one of the most extensively used (López, 2005). The Daisy^{II} system, developed by ANKOM Technology (Macedon, NY), has improved reproducibility in digestibility determination (Giraldo *et al.*, 2007) and increased the number of samples that can be analyzed at the same time. Batch cultures of mixed rumen microorganisms (Menke *et al.*, 1979; Theodorou *et al.*, 1994) are also commonly used for *in vitro* fermentation kinetic studies over variable incubation times. Nowadays, this technique is extensively used to evaluate the effects of different compounds and additives on microbial fermentation and methane

production as well (López *et al.*, 1999; Carro y Ranilla, 2003; Busquet *et al.*, 2006). However, batch cultures are not able to hold a viable microbial community over a long period of time due to the accumulation of fermentation end products and the lack of a continuous input of nutrients (López, 2005). Fermenters, as ruminal fermentation simulating systems, can overcome some limitations of batch cultures since they are operated under continuous input of substrates and output of fermentation products, which allow to reach steady state conditions and, as a consequence, the establishment of a stable microbial community can be expected (López, 2005). An appropriate use of ruminal fermentation simulating systems depends very much on to what extent they can maintain a microbiota representing that in the rumen under specific experimental conditions (Warner, 1956; Slyter y Putnam, 1967).

Rumen bacteria, archaea and protozoa populations (Slyter and Putnam, 1967; Mansfield *et al.*, 1995; Ziemer *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2010) and bacterial populations' structure (Martínez *et al.*, 2010; Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2011) have been studied in fermenters. However, no studies have been performed concerning fungi established in fermenters. There is little information about microbial populations developing in batch cultures (Muetzel *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2009) and, to our knowledge, no information concerning ruminal microbiota in Daisy^{II} incubator is available.

The aim of this work was to study the changes in ruminal microbiota throughout the incubation of rumen fluid in three different *in vitro* simulation techniques (ANKOM Daisy^{II} incubator, batch culture of mixed rumen microorganisms and single-flow continuous-culture fermenters).

MATERIAL AND METHODS

Experimental design, diets and animals

Three *in vitro* experiments were carried out using the ANKOM Daisy^{II} incubator (experiment 1), batch cultures of mixed rumen microorganisms (BCMRM, experiment 2) and single-flow continuous-culture fermenters (SFCCF, experiment

3). Ingredient composition of diets and chemical composition of ingredients are shown in **Tables 4.3.1** and **4.3.2**.

In experiment 1, barley grain, wheat bran, tomato and cucumber fruits, sunflower meal, cereal straw and alfalfa hay were incubated to determine their *in vitro* DM and OM digestibilities. In experiment 2, a control diet (CO, composed of wheat straw 30%, wheat bran 5%, sunflower meal 15%, alfalfa hay 22% and barley grain, 25%) was compared with different experimental diets in which 20, 60 or 100% of barley grain was replaced with tomato (diets T20, T60, T100), cucumber (diets C20, C60, C100) or a 1:1 mixture of tomato and cucumber (diets TC20, TC60, TC100). Therefore, the final proportion of vegetable wastes in the experimental diets was 5, 15 and 25%, respectively (**Table 4.3.1**). In experiment 3, only diets CO, T100, C100 and TC100 were studied.

Waste fruits of tomato and cucumber were obtained from the Plant of Wastes Treatment in Motril (Granada, Spain) that collects exceeding production from greenhouses horticulture in the area. Fruits were homogenized and freeze-dried previously to their inclusion in the experimental diets and their chemical compositions are shown in **Table 4.3.2**. Either control and experimental diets contained 1 % of a vitamin-mineral supplement composed (per kg) of 277 g NaCl, 270 g ashes from dried and extracted two-stage olive cake combustion, 250 g $(\text{PO}_4)_2\text{H}_4\text{Ca}$, 200 g MgSO_4 , 8.5 mg CoO, 4 mg Se, 2.5 mg I, and 83,500 and 16,700 IU of vitamins A and D, respectively.

Three adult dry non-pregnant rumen-fistulated Granadina goats (46.9 ± 2.15 kg BW) were used as rumen inoculum donors. Animals were placed in individual boxes with free access to water and were fed alfalfa hay at energy maintenance level (Prieto *et al.*, 1990) and the same mineral-vitamin mixture than the one used in *in vitro* experiments.

Animals' management and rumen content sampling were carried out by trained personnel. Animals were cared and handled in accordance with the Spanish guidelines for experimental animal protection (Royal Decree 1201/2005 of October 10 on the protection of animals used for experimentation or other scientific purposes) in line with the European Convention for the Protection of

Vertebrates used for Experimental and other Scientific Purposes (European Directive 86/609).

Table 4.3.1. Ingredient composition (g/kg dry matter) of the control and experimental diets¹.

Diet ¹	Ingredient							
	Barley grain	Wheat bran	Tomato	Cucumber	Sunflower meal	Cereal straw	Alfalfa hay	Mineral-mix
Control	250	50	0	0	150	300	220	30
T20	200	50	50	0	150	300	220	30
T60	100	50	150	0	150	300	220	30
T100	0	50	250	0	150	300	220	30
C20	200	50	0	50	150	300	220	30
C60	100	50	0	150	150	300	220	30
C100	0	50	0	250	150	300	220	30
TC20	200	50	25	25	150	300	220	30
TC60	100	50	75	75	150	300	220	30
TC100	0	50	125	125	150	300	220	30

¹Control: diet including 25% barley grain, 5% wheat bran, 15% sunflower meal, 30% cereal straw and 22% alfalfa hay; T20, T60, T100: diets including 5, 15, and 25% of tomato wastes, respectively; C20, C60, C100: diets including 5, 15, and 25% of cucumber wastes, respectively; TC20, TC60, TC100: diets including 5, 15, and 25% of a tomato: cucumber wastes mixture (1:1), respectively.

Table 4.3.2. Chemical composition (g/kg dry matter) and *in vitro* digestibility (g/g) of diet ingredients.

	Ingredient						
	Barley grain	Wheat bran	Tomato	Cucumber	Sunflower meal	Cereal straw	Alfalfa hay
DM, g/kg fresh matter	897	856	61.5	37.0	911	902	899
g/kg dry matter							
OM	974	943	899	887	930	935	900
NDF	185	395	191	168	445	621	400
ADF	112	191	139	131	223	357	267
ADL	56.2	90.1	48.7	2.50	37.0	4.00	14.0
EE	22.1	34.4	38.8	13.0	7.00	10.9	14.8
CP	90.4	154	153	163	329	71.2	165
Condensed tannins							
Free			4.71	15.0			
Fiber-bound			4.47	20.6			
Protein-bound			1.73	15.0			
Total ¹			10.9	50.6			
<i>In vitro</i> digestibility							
DMD	0.81	0.68	0.91	0.97	0.62	0.40	0.62
OMD	0.82	0.67	0.91	0.98	0.61	0.38	0.60

¹Calculated as free + fiber-bound + protein-bound tannins.

Experimental procedures

Experiment 1: ANKOM Daisy^{II} incubation

An ANKOM Daisy^{II} incubator (ANKOM Technology, Macedon, NY) was used and incubations were carried out following the procedure described by Tilley and Terry (1963). Rumen contents from 3 Granadina goats was withdrawn, pooled and squeezed through 4 layers of cheesecloth under anaerobic conditions. The filtered ruminal liquor was mixed with a buffer solution (McDougall, 1948) in a 1:4 (v:v) ratio to prepare the inoculum for the Daisy^{II} jars. Each jar was filled with 2 liters of buffered rumen fluid. Forty mL of this inoculum were kept at -20°C for subsequent DNA extraction. Samples (0.5 g ground at 1-mm) were introduced into ANKOM #F57 filter bags (ANKOM Technology, Macedon, NY) and incubated for 48 h at 39°C under constant rotation. Each jar contained 25 filter bags as maximum. After 48 h of incubation, liquid aliquots (40 mL) from the jars were taken and kept at -20°C for DNA extraction. The microbial activity in bags was stopped by freezing them at -20°C, then they were thawed at room temperature and incubated again in a 0.1 N HCl solution containing 2 g/l of pepsin (P-7012, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) for 48 h at 39 ± 1°C under constant agitation. After the second incubation phase, the bags were removed and rinsed thoroughly with cold tap water until water was clear and then dried in a forced draught oven at 60°C for 48 h. Finally, the bags were incinerated in a muffle furnace at 550°C for 3 h to determine the ash content. The dry and organic matter digestibilities were determined as their respective disappearance during the two-stage incubation.

Experiment 2: Batch cultures of mixed rumen microorganisms (BCMRM)

Two incubation runs were carried out during 72 h in 120 mL-Wheaton bottles inoculated with a mixture of filtered rumen content and a buffer solution. Ruminal content was obtained from 3 Granadina goats, mixed and strained through 4 layers of cheesecloth into an Erlenmeyer flask with an O₂ free headspace. The fluid was mixed with the buffer solution of Goering and van Soest (1970) in the proportion 1:4 (vol:vol) at 39°C under continuous flushing with CO₂. Forty mL of the buffered rumen liquor (BCMRM inoculum) were kept at -20°C for DNA extraction. Duplicate

samples of 0.5 g dry matter (DM) of control and experimental diets and of alfalfa hay, used as standard, were accurately weighed into the bottles prior the inoculation. Fifty mL of buffered rumen fluid were added to each bottle under CO₂ flushing. Bottles were sealed with butyl rubber stoppers and aluminum caps and incubated at 39°C. In every incubation run, 2 blanks were incubated as well. Pressure in the bottle headspace and volume of total gas produced were measured in each bottle at 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 and 72 hours, by using a pressure transducer and a calibrated syringe, respectively, as described by Theodorou *et al.* (1994). One bottle per treatment and blank were opened 24 h after inoculation, pH was measured immediately with a pH-meter and one aliquot of the bottle content was kept at -20°C for DNA extraction. The same procedure was repeated for the remaining bottles incubated for 72 h.

Experiment 3: Single-flow continuous-culture fermenters (SFCCF)

Eight SFCCF (AFORA, Barcelona, Spain) following the model of Miettinen and Sätälä (1989) were used. Fermenters were inoculated with pooled rumen liquor from 3 Granadina goats. Two 7-d incubation runs were carried out. Dietary treatments were assigned randomly, in each incubation run, so that two fermenters received the control or one of the 3 experimental diets. Therefore, each treatment (diet) was conducted with 4 repetitions. Rumen contents were collected, pooled and strained through four layers of cheesecloth under anaerobic conditions, and 700 mL of filtrate were inoculated into each fermenter. Forty mL of filtered rumen fluid (SFCCF inoculum) were kept at -20°C for DNA extraction. Each fermenter received daily 30 g of DM of the corresponding diet in two equal portions at 09:00 and 14:00 h. Flow through fermenters was maintained by continuous infusion of McDougall (1948) artificial saliva at a rate of 40 mL/h (5.3% dilution rate), CO₂ was continuously infused to keep anaerobic conditions, and the effluent from each fermenter was collected into a flask maintained in a bath at 3°C to prevent microbial growth. Twice a day pH was measured in the fermentation vessels immediately before feeding. On days 4 and 5 after inoculation, samples (40 mL) from the fermentation vessels content and from effluents were taken, respectively, and kept at -20°C for DNA extraction.

Analytical procedures

Chemical analyses

Ground (1-mm) samples of diet ingredients were analyzed for DM (method ID 934.01), ash (method ID 942.05), ether extract (method ID 7.045) and nitrogen (method ID 984.13) according to the AOAC (2005). Neutral (NDF) and acid (ADF) detergent fiber analyses were carried out according to van Soest *et al.* (1991) using an ANKOM²²⁰ Fiber Analyzer (ANKOM Technology, Macedon, NY). α - amylase enzyme was used for NDF analysis, and both NDF and ADF were expressed exclusive of residual ash. The ADL was determined by solubilization of cellulose with 72% sulphuric acid (van Soest *et al.*, 1991). Free and protein- and fiber-bound condensed tannins were sequentially extracted following the procedure described by Pérez-Maldonado and Norton (1996). Condensed tannins from quebracho powder (Roy Wilson Dickson Ltd., Mold, UK) were used as a standard.

DNA extraction

Freeze-dried samples of the ANKOM Daisy^{II} incubator, Wheaton bottles, fermenter contents and effluents were homogenized with steel beads in a Mini-Bead-beater 8 (BioSpec Inc, Bartlesville, OK) and total DNA was extracted by using the QIAmp[®] DNA Stool Mini Kit, following the manufacturer protocol (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

Quantification of microbial groups by Real Time quantitative PCR (RT-qPCR)

The numbers of total bacteria, *Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus flavefaciens*, fungi, methanogenic archaea and protozoa were quantified by RT-qPCR. Sets of primers and corresponding targeted genes are shown in **Table 4.3.3**. Optimization of primers concentration and annealing temperature were previously done. Optimal concentrations of reagents for RT-qPCR assay were 0.4 μ M of each primer, 1X iQ[™] SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) containing 100 mM KCl, 40mM Tris-HCl (pH 8.4), 0.4 mM of each dNTP, 6 mM

MgCl₂, 20 nM fluorescein, SYBR Green I, stabilizers and 0.05 U/μL *iTaq* DNA polymerase; and 10-75 ng of template DNA in a final volume of 25 μL. Amplification of each target group was carried out with the following program: one cycle at 95°C for 5 min, 40 cycles at 95°C for 15s, 60°C for 30s for annealing, 72°C for 55s for elongation and 75°C for 6s to measure the fluorescence emission. Each sample was amplified in triplicate in order to reduce the experimental error. The melting curve was built by measuring the decrease in fluorescence emissions with increased temperature from 55°C to 95°C. Ramps of 0.5°C were set every 10 seconds.

The absolute amounts of each group of microorganisms, expressed as log (gene copies/g fresh sample), were determined by using standards. The calibration curve was obtained by amplifying a serially diluted (10-fold) standard to provide a suitable range of copies for each target microorganism. The RT-qPCR standards are composed of the plasmid pCR®4-TOPO (Invitrogen™, Carlsbad, CA) with an inserted DNA fragment corresponding to each target sequence. Cloning of fragments into the plasmid and transformation of *E. coli* cells were carried out as described by the manufacturer. Bacteria carrying the plasmid were processed with the Pure Link™ Miniprep kit (Invitrogen™, Carlsbad, CA) and plasmids sequenced to check for the presence of the target inserts. Gene copies present in each plasmid extract were calculated using the plasmidic DNA concentration and the molecular weight of the vector with the insert.

Table 4.3.3. PCR primers used for all the molecular analyses.

Target group	Technique	Forward sequence	Reverse sequence	Ref.
Bacteria	RT - qPCR	GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA	ACGTCRTCCMCACCTTCCTC	Maeda <i>et al.</i> , 2003
<i>F. succinogenes</i>	RT - qPCR	GTTCCGGAATTACTGGGGTAAA (586)*	CGCCTGCCCTGAACTATC (706)*	Denman and McSweeney, 2006
<i>R. flavefaciens</i>	RT - qPCR	CGAACGGAGATAAATTTGAGTTTACTTAGG (96)*	CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC (220)*	Denman and McSweeney, 2006
Fungi	RT - qPCR	GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC	CAAAATCACAAAGGGTAGGATGATT	Denman and McSweeney, 2006
Methanogens	RT - qPCR	TTCGGTGGATCDCARAGRGC	GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC	Denman <i>et al.</i> , 2007
Protozoa	RT - qPCR	GCTTTCGWTTGGTAGTGATT (316)**	CTTGCCCTCYAATCGTWCT (539)**	Sylvester <i>et al.</i> , 2004
Bacteria	T-RFLP	FAM-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (27)*	ACGGGGGGTGTGTACAAG (1389)*	Hongoh <i>et al.</i> , 2003

* 5' end position in the 16S rRNA of *Escherichia coli*.

** 5' end position in the 18S rRNA of *Saccharomyces cerevisiae*.

Analysis of bacterial diversity and structure by terminal - Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

Almost the whole 16S rRNA gene (1300 bp) was amplified with the universal primers 27F and 1389R (**Table 4.3.3**) as described by Hongoh *et al.* (2003). The amplification mix contained 1X TAE buffer as supplied by the manufacturer, 2 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTPs, 1 mM each primer, 1 U *Taq* polymerase (Dominion – MBL, Córdoba, Spain) and 0.5 µL of template DNA in a final volume of 25 µL. The amplification program was: one 4 min cycle at 94°C, 25 cycles at 94°C, 55°C and 72°C for 1 min each one, one cycle at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 5 min. The PCR products were purified with Mbl PCR QuickClean Kit (DOMINION – Mbl, Córdoba, Spain). Twenty ng of amplified DNA were cut by mixing 1X SuRE/Cut Buffer L and 1 U of *HhaI* endonuclease (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in a final volume of 20 µL and incubating at 37°C for 5 h. Afterwards, the reaction was stopped by incubating at 80°C for 20 min. Digestion products were purified afterwards. Two µL of digestion products were mixed with 0.3 µL of GeneScan-600 LIZ size standard and 12 µL of deionised formamide (Hi-Di Formamide Applied Biosystems Inc, Foster City, CA). The mix was heated at 90°C for 2 min and cooled for at least 5 min. The restriction fragments were separated into 50 cm-capillars composed by the POP7 polymer. Capillary electrophoresis was carried out with a 3130xl Genetic Analyzer ABI PRISM (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Fluorescence data were analyzed by using the GeneMapper Software v 4.0 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) and the AFLP method. Peaks under 40 units of fluorescence were deleted.

Bacterial diversity was estimated by the Shannon index (Wiener, 1948; Shannon & Weaver, 1949): $H' = - \sum_{i=1}^S (P_i \ln P_i)$, where P_i is the percentage of the individuals belonging to the species i . The Shannon evenness (Magurran, 1988) was calculated following the mathematical expression: $E = H' (\ln S)^{-1}$, being S the total number of species and H' the previously calculated Shannon index. The percentages of T-RFs (Terminal Restriction Fragments) remaining after 48 h (ANKOM Daisy^{II} incubator), 24h (BCMRM) or 4 and 5 days (SFCCF) after inoculation were analyzed as well.

Statistical analyses

The effect of incubation time on microbial populations and bacterial diversity and evenness from each experiment were analyzed by 1-way ANOVA with SPSS software (IBM SPSS Statistics v.19, IBM Corp., Somers, NY). Differences between treatments were declared at $P \leq 0.05$. The LSD test was used to check the significant differences among treatments.

RESULTS AND DISCUSSION

Some authors have investigated the relative densities of bacteria, archaea and eukarya in rumen inocula and fermenters (Ziemer *et al.*, 2000; Muetzel *et al.*, 2009) and microbial populations and bacterial diversity in BCMRM (Muetzel *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2009). However, there is no information regarding the microbiota developed during rumen fluid incubation in the ANKOM Daisy^{II} system. This work aimed to study microbial populations and bacterial diversity in three different *in vitro* systems widely employed and to infer in what extend values found in the *in vitro* system represent those in the corresponding inocula.

Microbial abundances

In Daisy^{II} jars (**Figure 4.3.1, Graph I**) populations of total bacteria, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and fungi decreased ($P \leq 0.014$) after 48 h of incubation. The rapid disappearance of easily fermentable substrates would mainly explain the decreased microbial numbers, which was especially important ($P \leq 0.001$) for cellulolytic bacteria and fungi. The lack, in the inoculum incubated, of a feed matrix in which cellulolytic bacteria and fungi attach might have hindered the development of such fibrolytic microorganisms (Akin y Borneman, 1990; Krause *et al.*, 2003). Protozoa abundances did not change but did tend ($P = 0.053$) to be lower after 48 h of incubation. Methanogens numbers increased ($P < 0.001$) in the vessels after 48 of incubation. This fact could be due to a raise in the pH as a consequence of fermentable substrates disappearance and, thus, a decrease in fermentative activity of bacteria, especially of species degrading non-structural

carbohydrates (van Kessel and Russell, 1996). Regardless mentioned microbial declines, this *in vitro* system was able to sustain 49 and 31% of bacteria and protozoa, respectively, existing in the original inoculum before incubation (**Table 4.3.4**).

Table 4.3.4. Changes in the microbial abundances between incubation times in the different experiments. Values show the fold difference for every microbial group or species between the time points indicated.

	ANKOM Daisy ^{II} incubator	BCMRM ¹		SFCCF ²	
	0 - 48h	0 - 24h	24 - 72h	0 - 4 d	4 - 5 d
Bacteria	0.51	1.51	0.46	1.27	0.94
<i>F. succinogenes</i>	0.05	6.38	0.06	23.8	0.74
<i>R. flavefaciens</i>	0.04	1.98	0.23	14.6	0.41
Fungi	0.26	7.05	0.12	39.7	0.58
Methanogens	4.33	1.07	0.42	0.71	1.03
Protozoa	0.69	1.10	0.01	0.56	0.61

¹ Batch cultures of mixed rumen microorganisms.

² Single-flow continuous-culture fermenters.

In BCMRM (**Figure 4.3.1, Graph II**) bacteria, methanogens and protozoa did not change ($P \geq 0.314$) in numbers after 24 h of incubation but fibrolytic microorganisms (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and fungi) increased ($P < 0.001$). *F. succinogenes* and fungi increased 6.38-fold and 7.05-fold after 24 h of incubation, respectively (**Table 4.3.4**). Such increase in the abundance of fibrolytic microorganisms supports the use of BCMRM technique to evaluate high-fiber feedstuffs, even though they are inoculated with rumen liquor and, thus, without most of the solid-associated microbes (Merry and McAllan, 1983; Craig *et al.*, 1987). All the microbial groups declined ($P \leq 0.001$) after 72 h of incubation, reaching values which were lower or similar, in the case of fungi, to those found in the inoculum due to the substrate exhaustion. It is worth noting the dramatic descend in the numbers of protozoa after 72 h, very likely due to the decrease in bacteria availability (Williams y Coleman, 1997). However, protozoa decline was

much sharper than bacteria descent. It is known that some protozoa can degrade soluble carbohydrates, pectins, cellulose and hemicellulose (Jouany y Ushida, 1990). Thus, it might be possible that not only bacteria decline caused such an important descent in protozoa but also the exhaustion of some substrates after 72 h of incubation.

After 4 days of incubation, total bacteria numbers did not change ($P = 0.382$) in fermenter flasks (**Figure 4.3.1, Graph III**) but the other considered microorganisms showed some changes. As in BCMRM, fibrolytic populations (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and fungi) increased ($P \leq 0.001$) after 4 d of incubation. On the contrary, methanogens and protozoa declined ($P \leq 0.005$). Previous studies have reported that SFCCF cannot hold protozoa populations beyond the first day of incubation (Moumen *et al.*, 2009). The disappearance of protozoa in fermenters could drive in turn the decrease in some methanogens, closely associated to ciliate protozoa (Krumholz *et al.*, 1983; Finlay *et al.*, 1994).

Comparison between fermenter contents in d 4 and effluents in d 5 after inoculation was done to assess to what extent microorganisms in effluents can represent those in fermenter vessels. Total bacteria, methanogens and protozoa showed similar ($P \geq 0.152$) densities in fermenter vessels and effluents but fibrolytic microorganisms were lower ($P \leq 0.045$) in effluents than in fermenter contents. Spatial localization of these microbial groups in the rumen could explain such divergences: cellulolytic bacteria and fungi are predominantly attached to solid particles of fiber while protozoa and methanogens can be found both in the liquid and solid fractions of digesta or even attached to the rumen epithelium (Williams and Coleman, 1997; Janssen and Kirs, 2008). The liquid:solid ratio is higher in effluents than in fermenter contents and, consequently, the presence of particles-associated microorganisms should be lower in the former.

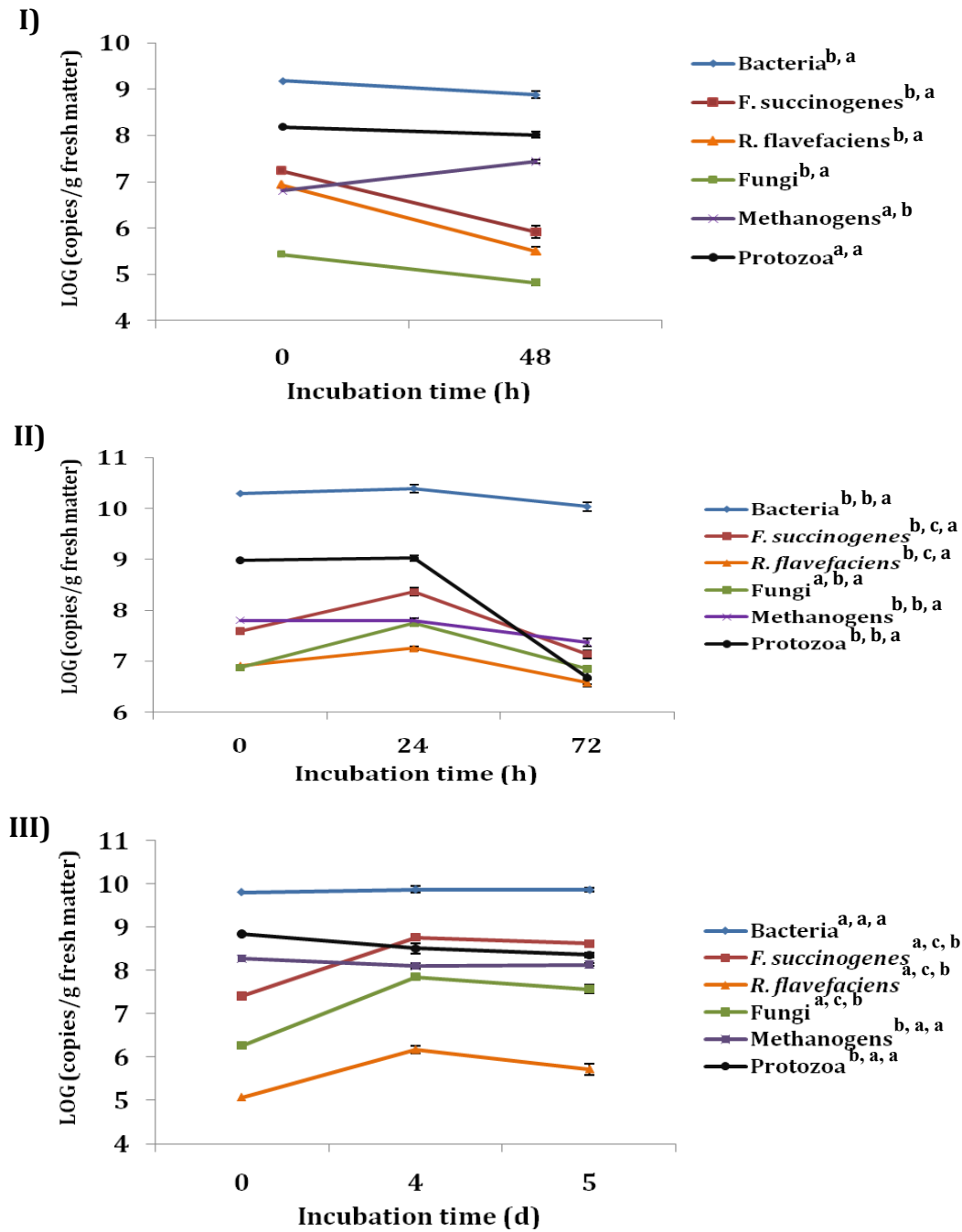


Figure 4.3.1. Evolution of microbial numbers in different *in vitro* systems: **I) ANKOM Daisy^{II} incubator; II) BCMRM; and III) fermenter vessels (day 4) and effluents (day 5) of SFCCF.** Time 0 represents values found in the respective inoculum: buffered rumen liquor for ANKOM Daisy^{II} incubator and BCMRM, and rumen liquor for SFCCF. Error bars represent SEM.

a, b, c for the same microbial group or species mean different ($P \leq 0.05$) abundances for different incubation times.

An increase of fibrolytic microorganisms was observed both in BCMRM and SFCCF after 24 h and 4 d of incubation, respectively. Due to the filtration process involved in inoculum preparation, the vast majority of these microorganisms in the rumen content are removed along with the solid particles but the remaining bacteria and fungi might rapidly attach to solids, grow and multiply. Some authors have found that most part of the fiber colonization in bags (*in sacco* technique) by cellulolytic species, takes place in only 10 minutes and that the maximum bacterial growth is achieved in 24 h (Koike *et al.*, 2003). The evolution of methanogens both in the Daisy^{II} incubator and the BCMRM are worth noting. These microorganisms were the only group in the Daisy^{II} incubator that showed an increase after 48 h of incubation. In BCMRM methanogens did not increase during the first 24 h of incubation but after 72 h incubation, 42% of populations registered at 24 h were still maintained. In this *in vitro* system, total bacteria and methanogens were the groups that decreased less, while the other studied microbial groups showed an important decline (**Table 4.3.4**). A possible explanation may be based on the energy metabolism of methanogens. These microorganisms do not obtain energy directly from feedstuffs degradation but from the H₂ generated in fermentations carried out by rumen bacteria, fungi and protozoa (Janssen and Kirs, 2008). Although fermentation steady state in batch cultures is reached approximately after 24 hours, methanogens could use H₂ longer after fermentable substrates had run out. The abundances of methanogens throughout the incubation time in BCMRM support the use of this technique to evaluate the methane production associated to feedstuff fermentation or the anti-methanogenic potential of different compounds (Newbold *et al.*, 2005; Bodas *et al.*, 2008). In SFCCF methanogens decreased after 4 d of incubation. Protozoa decline in the system might have a direct or indirect effect on the descent of methanogens. Either the disappearance of uniquely protozoan-associated methanogens or the broader changes in ruminal physiology as a result of protozoa decline could have affected archaeal populations (Janssen and Kirs, 2008).

Bacterial diversity and structure

The Shannon index and evenness were lower ($P = 0.045$ and $P = 0.049$, respectively) in Daisy^{II} jars after 48 h of incubation than in the non-incubated inoculum (**Table 4.3.5**). In BCMRM both diversity and evenness were reduced ($P \leq 0.001$) after 24 h of incubation, as well. However, in SFCCF, evenness decreased ($P < 0.001$) but bacterial diversity did not change ($P = 0.959$) after 4 d of incubation.

As mentioned before, batch cultures are unable to hold microbial growth for a long period of time due to the rapid substrate degradation and hence most of the microbial species are very likely to decline as a result. Those species with lower abundances would be the most affected. The densities of minority species could decrease under the detection level of T-RFLP technique or even disappear from the culture. On the contrary, in continuous-flow systems, the constant input of diet and output of fermentation products can sustain metabolic activities of microbiota throughout the time. Bacterial diversity and bacterial density did not vary when inoculum and fermenter contents taken the 4th day of incubation were compared but higher evenness was observed in the latter. Thus, a readjustment in the relative abundances of some bacterial species could have occurred. It is possible that fermenter environment promoted the growth of some species and the decline of others at the same time. Mansfield *et al.* (1995), in an *in vivo* – *in vitro* (dual flow continuous culture fermenters) comparative study, found lower abundances of cellulolytic bacteria in fermenters than in the rumen but no differences regarding amylolytic and proteolytic bacteria.

Table 4.3.5. Bacterial diversity and evenness in Daisy^{II} incubator, batch cultures of mixed rumen microorganisms (BCMRM) and single-flow continuous-culture fermenters (SFCCF).

	ANKOM Daisy ^{II} incubator			BCMRM			SFCCF						
	0 h	48 h	SEM	P-value	0 h	24 h	SEM	P-value	0 d	4 d	5d	SEM	P-value
	Shannon index	2.45 ^b	1.45 ^a	0.191	0.045	2.41 ^b	1.98 ^a	0.058	0.001	2.42	2.43	2.23	0.075
Shannon evenness	0.972 ^b	0.591 ^a	0.075	0.049	0.914 ^b	0.739 ^a	0.017	0.000	0.758 ^a	0.882 ^b	0.742 ^a	0.010	< 0.001

SEM = standard error of the mean.

To assess the changes in bacterial composition, the T-RFs in Daisy^{II} incubator after 48 h of incubation, those in BCMRM after 24 h of incubation and those in SFCCF after 4 and 5 d of incubation were analyzed in comparison to T-RFs in the respective inocula used in each *in vitro* procedure (**Figures 4.3.2**). **Figure 4.3.2.I** shows the percentage of peaks found in the Daisy^{II} jars after 48 h. It is quite noticeable that a high proportion of T-RFs (62.5%) disappeared after 48 h of incubation. In BCMRM (**Figure 4.3.2.II**) and SFCCF (**Figure 4.3.2.III**), the information has been grouped according to the incubation run. In BCMRM a significant part of bacterial species disappeared during the course of 24 hours in both runs (56.3% and 88.9% in period I and II, respectively, **Graph II**). However, in both SFCCF incubation runs (**Graph III**) the major part of T-RFs found in the inoculum remains after 4 days of incubation (only 7.41% and 4.55% of T-RFs from the inoculum disappeared in period I and II, respectively). T-RFs in effluents were mainly the same than in fermenters, although, as shown in Graph III, in period I part of the peaks present in fermenter contents disappeared (11.1%) in the effluents.

The proportion of T-RFs that disappeared was very high both in the Daisy^{II} and in BCMRM. However, an important variability in peaks found in each system was observed. Part of this variability can rely either on the inoculum used, which was not taken the same day for both experiments, or on the buffer composition, which differs between techniques. In SFCCF the percentage of T-RFs in fermenter contents was very similar to that found in the inoculum, which is in accordance to our previous observations on no differences in bacterial diversity between the inoculum, fermenter contents and effluents. This is in agreement with Slyter and Putnam (1967) study, who found, using cultures techniques, the same predominant bacteria in the rumen of steers and in fermenters, in spite of the fact that they could only identify a small proportion of bacteria in fermenters. Our findings also agree with Martínez *et al.* (2010) who found similar numbers of ARISA peaks in liquid associated bacteria (LAB) both in rumen and Rusitec but a different bacterial community structure.

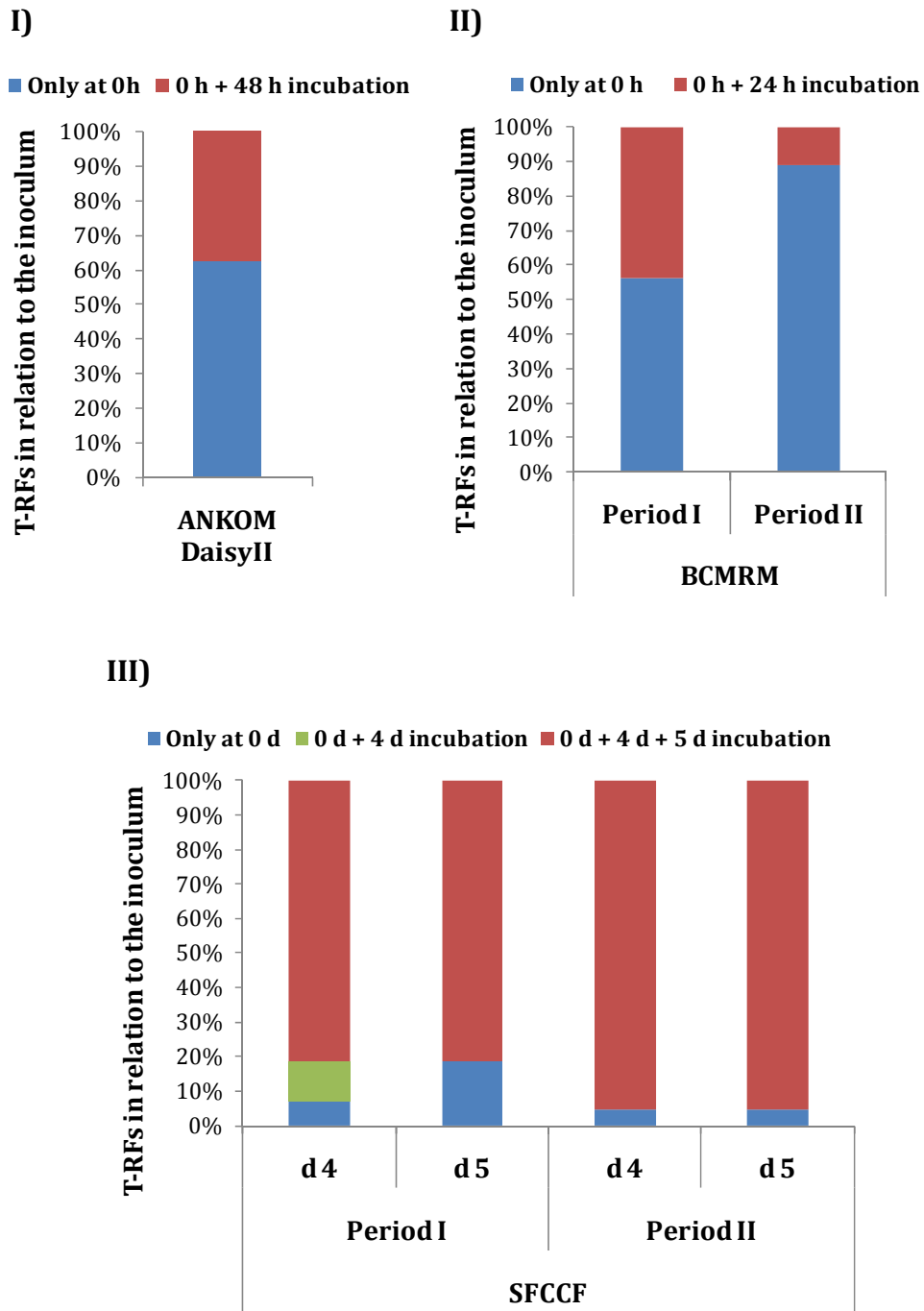


Figure 4.3.2. Percentage of T-RFs found in: **I) Daisy^{II}** jars after 48 hours; **II) BCMRM** after 24 hours and **III) SFCCF** after 4 and 5 days of incubation, which were equal to those found in the respective inocula. Samples in SFCCF were taken from fermenter vessels (day 4) and from effluent vessels (day 5).

Conclusions

Our results show that short term *in vitro* simulation techniques, such as ANKOM Daisy^{II} system and BCMRM, regardless an important decrease in bacterial diversity, may support abundances of the main microbial groups, after 24 h incubation, very similar to those found in the liquid fraction of the rumen content. On the other hand, a longer term simulation technique, such as SFCCF, is able to maintain microbial abundances and bacterial diversity and structure similar to those in rumen fluid. The effluents collected from fermenters hold a microbiota similar to that developed in the fermentation flasks, with the exception of cellulolytic populations, which supports the suitability of effluents for analyzing some fermentation parameters.

Acknowledgments

This research was supported by Junta de Andalucía (Excellence Programme, Project P05-AGR-00408) and Spanish National Research Council (“Proyecto Intramural”-CSIC-200740I021). E. C. Soto gratefully acknowledges support from CSIC for I3P grant. Thanks to J. Fernández, T. García and I. Jiménez for technical assistance.

REFERENCES

- AOAC INTERNATIONAL, 2005. Official Methods of Analysis. 18th ed. Assoc. Off. Anal. Chem. Gaithersburg, MD.
- Akin, D.E., Borneman, W.S., 1990. Role of rumen fungi in fiber degradation. *J. Dairy Sci.* 73, 3023-3032.
- Bodas, R., López, S., Fernández, M., García-González, R., Rodríguez, A.B., Wallace, R., González, J., 2008. *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 245-258.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 89, 761-771.

- Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D.R., Newbold, C.J., Molina-Alcaide, E., 2011. The effect of the feed-to-buffer ratio on bacterial diversity and ruminal fermentation in single-flow continuous-culture fermenters. *J. Dairy Sci.* 94, 1374-1384.
- Carro, M.D., Ranilla, M.J., 2003. Effect of the addition of malate on *in vitro* rumen fermentation of cereal grains. *Br. J. Nutr.* 89, 181-188.
- Chen, X.L., Wang, J.K., Wu, Y.M., Liu, J.X., 2008. Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid- and solid-associated ruminal microbes *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141, 1-14.
- Cheng, Y.F., Edwards, J.E., Allison, G.G., Zhu, W.Y., Theodorou, M.K., 2009. Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch culture. *Bioresour. Technol.* 100, 4821-4828.
- Craig, W.M., Broderick, G.A., Ricker, D.B., 1987. Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. *J. Nutr.* 117, 56-62.
- Denman, S.E., McSweeney, C.S., 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 572-582.
- Denman, S.E., Tomkins, N.W., McSweeney, C.S., 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 313-322.
- Finlay, B.J., Esteban, G., Clarke, K.J., Williams, A.G., Embley, T.M., Hirt, R.P., 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 117, 157-161.
- Giraldo, L.A., Gutiérrez, L.A., Rúa, C., 2007. Comparison between *in vitro* and *in situ* protocols for estimating true digestibility of several tropical forages. *Rev. Colomb. Cienc. Pecuaria.* 20, 269-279.
- Goering, M.K., van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). *Agr. Handbook 379*. USDA - ARS. Washington, DC
- Hongoh, Y., Yuzawa, H., Ohkuma, M., Kudo, T., 2003. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 299-304.

- Janssen, P.H., Kirs, M., 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environ. Microbiol.* 74, 3619-3625.
- Jouany, J.P., Ushida, K., 1990. Protozoa and fibre digestion in the rumen, In: Hoshino, S., Onodera, R., Minato, H., Itabashi, H. (Eds.), *The Rumen Ecosystem: The Microbial Metabolism and Its Regulation*, Japan Scientific Societies Press, pp. 139-150.
- Koike, S., Pan, J., Kobayashi, Y., Tanaka, K., 2003. Kinetics of *in sacco* fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *J. Dairy Sci.* 86, 1429-1435.
- Krause, D.O., Denman, S.E., Mackie, R.I., Morrison, M., Rae, A.L., Attwood, G.T., McSweeney, C.S., 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 663-693.
- Krumholz, L.R., Forsberg, C.W., Veira, D.M., 1983. Association of methanogenic bacteria with rumen protozoa. *Can. J. Microbiol.* 29, 676-680.
- López, S., 2005. *In vitro* and *in situ* techniques for estimating digestibility, In: Dijkstra, J., Forbes, J.M., France, J. (Eds.). *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- López, S., Valdes, C., Newbold, C.J., Wallace, R.J., 1999. Influence of sodium fumarate addition on rumen fermentation *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 81, 59-64.
- Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Koikeguchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F., Takashiba, S., 2003. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 39, 81-86.
- Magurran, A.E., 1988. *Ecological Diversity and Its Measurement*. Chapman and Hall, London, UK.
- Mansfield, H.R., Endres, M.I., Stern, M.D., 1995. Comparison of microbial fermentation in the rumen of dairy cows and dual flow continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55, 47-66.
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Saro, C., Carro, M.D., 2010. Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. II. Protozoa population and diversity of bacterial communities. *J. Dairy Sci.* 93, 3699-3712.

- McDougall, E.I., 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43, 99-109.
- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci.* 93(01): 217-222.
- Merry, R.J., McAllan, A.B., 1983. A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta. *Br. J. Nutr.* 50, 701-709.
- Miettinen, H., Setälä, J., 1989. Design and development of a continuous culture system for studying rumen fermentation. *J. Agr. Sci. Finland.* 61, 463-473.
- Moumen, A., Yáñez-Ruiz, D.R., Carro, M.D., Molina-Alcaide, E., 2009. Protozoa evolution in single-flow continuous culture and Rusitec fermenters fed high-forage diets. *Options Méditerranéenes.* 85, 303-308.
- Muetzel, S., Hoffmann, E.M., Becker, K., 2003. Supplementation of barley straw with *Sesbania pachycarpa* leaves *in vitro*: effects on fermentation variables and rumen microbial population structure quantified by ribosomal RNA-targeted probes. *Br. J. Nutr.* 89, 445-453.
- Muetzel, S., Lawrence, P., Hoffmann, E.M., Becker, K., 2009. Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 151, 32-43.
- Newbold, C.J., López, S., Nelson, N., Ouda, J.O., Wallace, R.J., Moss, A.R., 2005. Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 94, 27-35.
- Pérez-Maldonado, R.A., Norton, B.W., 1996. The effects of condensed tannins from *Desmodium intortum* and *Calliandra calothyrsus* on protein and carbohydrate digestion in sheep and goats. *Br. J. Nutr.* 76, 515-533.
- Prieto, C., Aguilera, J.F., Lara, L., Fonollá, J., 1990. Protein and energy requirements for maintenance of indigenous Granadina goats. *Br. J. Nutr.* 63, 155-163.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1949. The mathematical theory of information. University of Illinois Press, Urbana, IL.
- Slyter, L.L., Putnam, P.A., 1967. *In vivo* vs. *in vitro* continuous culture of ruminal microbial populations. *J. Anim. Sci.* 26, 1421.

- Sylvester, J.T., Karnati, S.K.R., Yu, Z., Morrison, M., Firkins, J.L., 2004. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using Real-Time PCR. *J. Nutr.* 134, 3378-3384.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185-197.
- Tilley, J.M.A., Terry, R.A., 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Grass and Forage Sci.* 18, 104-111.
- van Kessel, J.A.S., Russell, J.B., 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20, 205-210.
- van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.
- Warner, A.C.I., 1956. Criteria for establishing the validity of *in vitro* studies with rumen microorganisms in so-called artificial rumen systems. *J. Gen. Microbiol.* 14, 733-748.
- Wiener, N., 1948. *Cybernetics or Communication and Control in the Animal and the Machine.* John Wiley and Sons, New York.
- Williams, A.G., Coleman, G.S., 1997. The rumen protozoa. In: Hobson, P.N., Stewart, C.S. (Eds.). *The Rumen Microbial Ecosystem.* Chapman & Hall, London, UK, pp. 73-139.
- Ziemer, C.J., Sharp, R., Stern, M.D., Cotta, M.A., Whitehead, T.R., Stahl, D.A., 2000. Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S ribosomal RNA-targeted probes. *Environ. Microbiol.* 2, 632-643.

Publicación 4

Does replacement of barley with greenhouse horticulture wastes modify *in vitro* ruminal fermentation, microbial growth and microbiota?

Soto E. C., D. R. Yáñez-Ruiz, H. Khelil, E. Molina-Alcaide

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

(Enviado a Journal of Dairy Science)

ABSTRACT

The ruminal fermentation promoted by a control diet composed of cereal straw (30%), wheat bran (5%), sunflower meal (15%), alfalfa hay (22%) and barley grain (25%) and by different experimental diets in which barley grain was replaced with increasing amounts of wastes of tomato (T1-5), cucumber (C1- C5) or a mixture (1:1) of both wastes (TC1-5) was studied in batch cultures (Experiment 1). Control and experimental diets including the highest amount of tomato (T5), cucumber (C5) or the mixture of both wastes (TC5) were also evaluated in single-flow continuous-culture fermenters (Experiment 2). Both *in vitro* systems were inoculated with rumen liquor from ruminally fistulated Granadina goats. To obtain the kinetic of gas production (GP) the exponential model $y = A [1 - e^{-c \cdot t}]$ was used. In batch cultures no effects of the waste type and their level of inclusion in diet on pH ($P \geq 0.304$), GP ($P \geq 0.689$), volatile fatty acids (VFA) concentration and most of the individual VFA molar proportions ($P \geq 0.128$) were observed. In single-flow continuous-culture fermenters no clear trend in the concentration of total and individual VFA was observed when comparing experimental and control diets with the exception of decreased proportions of *iso*-butyrate ($P = 0.002$) and *iso*-valerate ($P = 0.004$) in fermenters fed the experimental diets in comparison with the control one. Higher ($P = 0.009$) acetate:propionate ratio for diet T5 compared with the control one was observed. Nitrogen flow and degradation, composition of effluent bacteria and bacterial growth and its efficiency were not affected ($P \geq 0.091$) by treatments. Results from both batch cultures and single-flow continuous-culture fermenters indicate that tomato and cucumber wastes can be included in diets as barley grain alternatives without compromising ruminal fermentation and bacterial growth.

Key words: barley, batch cultures, greenhouses wastes, bacterial growth, ruminal fermentation, single-flow continuous-culture fermenters.

INTRODUCTION

In harsh conditions, prevailing in Mediterranean areas, the scarceness or low availability of pastures is responsible for a high dependence of animal feeding on grain concentrates. Due to high prices of cereals (FAO, 2010) and competition with human nutrition, alcoholic beverages and fuel ethanol production, it would be interesting to find alternative to cereals grains for animals feeding. The use of unconventional feedstuffs such as agriculture by-products and wastes could reduce production costs and, additionally, alleviate certain environmental issues (Vasta *et al.*, 2008).

In Mediterranean countries, greenhouse horticulture accounts for 15% of total world production and Spain is the main producer in this area (MARM, 2009). Greenhouse horticulture generates wastes, mainly fruits as tomato and cucumber, which have to be stored before disposal, creating economical and environmental problems. Tomato pulp and pomace, by-products of tomato processing industry, have been studied (Fondevila *et al.*, 1994; Ojeda and Torrealba, 2001; Denek and Can, 2006; Aghajanzadeh-Golshami *et al.*, 2010) but to our knowledge there is little information on the use of tomato (Ventura *et al.*, 2009) and null data concerning the use of cucumber fruits in ruminants feeding.

The efficient use of alternative feedstuffs requires an evaluation of their effects on ruminal fermentation. Both batch cultures and continuous-culture fermenters may provide useful information in that sense, without compromising animal health (Tapia *et al.*, 2002; Doce *et al.*, 2009).

The objective of the present work was to study the effect of substituting barley grain with greenhouse horticulture wastes (tomato, cucumber or a mixture 1:1 of both) on *in vitro* ruminal fermentation and bacterial growth.

MATERIALS AND METHODS

Diets

A control diet (CO) composed (dry matter basis) of wheat straw (30%), wheat bran (5%), sunflower meal (15%), alfalfa hay (22%) and barley grain (25%) was used. The experimental diets were formulated by replacing 5, 10, 15, 20 and 25% of barley grain with tomato (diets T1, T2, T3, T4 and T5, respectively), cucumber (diets C1, C2, C3, C4 and C5, respectively) or a mixture (1:1) of tomato and cucumber (diets TC1, TC2, TC3, TC4 and TC5, respectively). All the diets contained 3 % of a vitamin-mineral supplement composed (per kg) of 277 g NaCl, 270 g ashes from dried and extracted two-stage olive cake combustion, 250 g $(\text{PO}_4)_2\text{H}_4\text{Ca}$, 200 g MgSO_4 , 8.5 mg CoO, 4 mg Se, 2.5 mg I, and 83,500 and 16,700 IU of vitamins A and D, respectively. Control and experimental diets, whose ingredient composition is shown in **Table 4.4.1**, were incubated in batch cultures (Experiment 1). Diets CO, T5, C5 and TC5 were incubated in single-flow continuous-culture fermenters as well (Experiment 2). Tomato and cucumber were wastes from greenhouse horticulture in Granada coast and were collected at the Plant of Wastes Treatment Factory in Motril (Granada, Spain), freeze-dried and then ground before being analyzed and included in the experimental diets.

Animals

Three adult dry non-pregnant rumen-fistulated Granadina goats (46.9 ± 2.15 kg BW) were used as inoculum donors. Animals were placed in individual pens, had free access to water and were fed alfalfa hay at energy maintenance level (Prieto *et al.*, 1990) and mineral-vitamin mixture.

Animals' management and rumen content sampling were carried out by trained personnel. Animals were cared and handled in accordance with the Spanish guidelines for experimental animal protection (Royal Decree 1201/2005 of October 10 on the protection of animals used for experimentation or other scientific purposes) in line with the European Convention for the Protection of Vertebrates used for Experimental and other Scientific Purposes (European Directive 86/609).

Table 4.4.1. Ingredient composition (g/kg dry matter) of the control and experimental diets¹.

Diet ¹	Ingredient							
	Barley grain	Wheat bran	Tomato	Cucumber	Sunflower meal	Cereal straw	Alfalfa hay	Mineral-mix
Control	250	50	0	0	150	300	220	30
T1	200	50	50	0	150	300	220	30
T2	150	50	100	0	150	300	220	30
T3	100	50	150	0	150	300	220	30
T4	50	50	200	0	150	300	220	30
T5	0	50	250	0	150	300	220	30
C1	200	50	0	50	150	300	220	30
C2	150	50	0	100	150	300	220	30
C3	100	50	0	150	150	300	220	30
C4	50	50	0	200	150	300	220	30
C5	0	50	0	250	150	300	220	30
TC1	200	50	25	25	150	300	220	30
TC2	150	50	50	50	150	300	220	30
TC3	100	50	75	75	150	300	220	30
TC4	50	50	100	100	150	300	220	30
TC5	0	50	125	125	150	300	220	30

¹Control: diet including 25% barley grain, 5% wheat bran, 15% sunflower meal, 30% cereal straw and 22% alfalfa hay; T1, T2, T3, T4, T5: diets including 5, 10, 15, 20 and 25% of tomato wastes, respectively; C1, C2, C3, C4, C5: diets including 5, 10, 15, 20 and 25% of cucumber wastes, respectively; TC1, TC2, TC3, TC4, TC5: diets including 5, 10, 15, 20 and 25% of a tomato: cucumber wastes mixture (1:1), respectively.

Experimental procedure and sampling

Experiment 1: Batch Cultures of Mixed Rumen Microorganism (BCMRM).

Batch cultures of mixed rumen micro-organisms were used to study the ruminal fermentation and gas production induced by control and experimental diets. Three 72-h incubation runs were carried out in three consecutive weeks. Rumen content was taken from each of the 3 goats, and then pooled, strained through 4 layers of cheesecloth and the fluid collected in an Erlenmeyer flask under continuous CO₂ flushing. Inoculum for batch cultures was composed of rumen fluid and buffer solution (Goering and van Soest, 1970) in a proportion 1:4 (vol/vol).

The experimental procedure was based in Theodorou *et al.* (1994) protocol with some modifications. In each incubation run, duplicate samples of 0.5 g DM of

control and experimental diets, along with alfalfa hay as standard and blanks were incubated in 120-mL serum bottles. Fifty mL of the inoculum at 39°C were added to each bottle under continuous CO₂ flushing. Bottles were sealed with butyl rubber stoppers and aluminum caps and incubated at 39°C in a water bath. Headspace pressure and volume of gas produced were measured using a Wide Range Pressure Meter (Sper Scientific LTD, Scottsdale, AZ) and a calibrated syringe, respectively, at 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 and 72 h after inoculation. In each incubation run, one bottle per diet, standard and blank was withdrawn 24 h after inoculation and fermentation stopped by placing them into ice. Then, bottles were uncapped and the pH was immediately measured. Three sub-samples of the bottles content were collected: 1 mL was added to 1 mL of deproteinising solution (20 g metaphosphoric acid and 4 g of crotonic acid per L of 0.5 M-HCl) for VFA analysis; 1 mL was added to 1 mL of 0.5 M-HCl for ammonia analysis, and 5 mL were kept for total N analysis. The remaining content of bottles was lyophilized for DM and NDF content analyses. The rest of the bottles were maintained for 72 h after inoculation and fermentation was stopped following a similar procedure to the one previously described for bottles incubated during 24 h.

Experiment 2: Single-Flow Continuous-Culture Fermenters (SFCCF). Eight SFCCF following the design of Miettinen and Sätälä (1989) were used. Rumen content from 3 goats was collected, pooled and filtered as it was stated in Experiment 1. Seven hundred mL of rumen fluid were inoculated into each fermenter under continuous CO₂ flushing.

Two 7-d incubation runs were carried out. Each incubation run consisted of 4-d for adaptation and 3-d for sampling. In each incubation run, each diet (CO, T5, C5 and TC5) was supplied to two fermenters. Therefore, at the end of the trial, all the diets were conducted with four repetitions. Flow through fermenters was maintained by continuous infusion of artificial saliva (McDougall, 1948) at a rate of 40 mL/h (5.3% dilution rate), CO₂ was continuously infused to keep anaerobic conditions, and the effluent from each fermenter was collected into a vessel maintained at 3°C in a water bath to prevent microbial growth.

Twice a day (at 09:00 and 14:00 h) pH was measured in the fermentation vessels immediately before feeding and then fermenters received 15 g (DM) of the corresponding diet. Every sampling day the effluent from each fermenter was removed and weighed, the volume recorded and 500 mL sub-samples were taken to isolate effluent bacteria (EB). Aliquots of effluents were also taken for total and ammonia N and VFA analyses. Before being analyzed, the aliquots were prepared as described in the Experiment 1. The remaining effluents were pooled for the 3 sampling days, stored at -20°C and freeze dried before analyzed for DM, organic matter (OM) and ether extract (EE). Purine bases (PB) content was analyzed in EB pellets and effluents.

Isolation of effluent bacteria

Approximately 400 mL of effluent were homogenized gently in a blender for 10 sec and then strained through 4 layers of cheesecloth and 1 layer of nylon ($40\ \mu\text{m}$). This filtrate, which represents bacteria associated to liquid, was stored at 4°C (filtrate 1). Solid was resuspended in a NaCl (0.9% w:v) plus methylcellulose (0,1% w:v) solution, previously cooled at 4°C . This suspension was incubated at 39°C for 15 min with agitation, treated in a stomacher (IUL Instruments S.A., Barcelona, Spain) for 5 min and stored at 4°C for 24 h and then mixed in a blender and strained through 4 layers of cheesecloth and 1 layer of nylon as described above. This latter filtrate represents bacteria associated to solids (filtrate 2). Filtrates 1 and 2 were combined and centrifuged twice (Sorvall RC-6 Plus, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) at 4°C . First centrifugation was conducted at $500 \times g$ for 10 min in order to remove protozoa and feed particles. The supernatant obtained was centrifuged at $20\ 000 \times g$ for 30 min. The pellet from the second centrifugation, which represented solid and liquid associated bacteria (EB), was freeze-dried to be analyzed.

Chemical analyses

Concentrations of DM (method ID 934.01), ash (method ID 942.05), EE (method ID 7.045), and total N (method ID 984.13) were analyzed according to the AOAC (2005) procedures. NDF and ADF analyses were carried out according to van Soest *et al.* (1991) using an ANKOM Model 220 Fiber Analyzer (ANKOM Technology, Macedon, NY). α - amylase enzyme was used for NDF analysis, and both NDF and ADF were expressed exclusive of residual ash. Acid detergent lignin (van Soest *et al.*, 1991) was determined by solubilization of cellulose with 72% sulphuric acid. Free and protein- and fiber-bound condensed tannins were sequentially extracted following the procedure described by Pérez-Maldonado and Norton (1996). Condensed tannins from quebracho powder (Roy Wilson Dickson Ltd., Mold, UK) were used as a standard.

Concentration of N-NH₃ was determined colorimetrically by using the phenol-hypochlorite method (Weatherburn, 1967). Individual VFA were analyzed using the gas chromatography technique (Isac *et al.*, 1994). Purine bases in EB and effluent samples were determined following the procedure described by Balcells *et al.* (1992) using HPLC.

Calculations and statistical analysis

The gas produced in batch cultures was adjusted to the model: $y = A [1 - e^{-ct}]$ where **y** represents the cumulative gas production (mL); **t**, the incubation time (h); **A**, the asymptote (potential gas at the steady state; mL) and **c**, the gas production rate. The amount of VFA in the batch cultures bottles content after 24 h of incubation was corrected for the amount of VFA in the rumen liquid used as inoculum. The DM truly digested was calculated according to van Soest *et al.* (1966) as:

True digested DM = (DM input - FND output)/DM input, FND output being that analyzed in the residue after 24 h incubation.

Outputs of nutrients in SFCCF were obtained from the daily effluent flow and corresponding concentrations. The apparent digestibility of total carbohydrates

(CHO) in the fermenters was calculated from the input of CHO, estimated as the input of total OM – (CP + EE), and the output of CHO, corrected for the amount of hexoses in the VFA's produced (Demeyer and van Nevel, 1979). The true dietary OM digestibility was calculated taking into account the amount of bacterial OM in the effluents.

The daily bacterial N synthesis (mg/d) was estimated by multiplying the non ammoniacal N (NAN) output by the PB:N ratio in effluents and EB pellets. The efficiency of bacterial synthesis (EBS) was expressed as mg of bacterial N per g digested carbohydrates, g of OM intake or g of true digested OM.

Data from batch cultures were analyzed as a univariate model using the GLM procedure of SPSS (IBM SPSS Statistics v.19, IBM Corp., Somers, NY). The linear model used for each dependent variable accounted for the effects of waste type (WT), level of inclusion of the waste in the corresponding diet (WL) and WT × WL interaction. Data from SFCCF were analyzed by using the same software comparing diet means (C0, T5, C5 and TC5) as one way ANOVA. Differences between individual experimental units (bottles or fermenters) and between different incubation runs were considered as random effects. Effects were considered significant at $P \leq 0.05$. When significant differences were detected, differences among means were tested using the LSD comparison test.

RESULTS

The composition of ingredients used to formulate control and experimental diets is shown in **Table 4.4.2**. OM and CP contents were similar in tomato and cucumber wastes (899 and 887 and 153 and 163 g / kg dry matter, respectively). CP values in wastes were higher than in barley grain (90.4 g/kg DM). Lignin, ether extract and total condensed tannins contents were higher in tomato than in cucumber wastes. Non structural carbohydrates (NSC), calculated following the mathematical expression $NSC = OM - (EE + CP + NDF)$, were 676.5, 516.2 and 543 g/kg DM for barley grain, tomato and cucumber respectively. Dry matter and organic matter digestibility values were pretty high and similar in both wastes and slightly higher than those found in barley grain. Overall, we could see that incrementing barley

substitution results in a decrease of OM and NSC and an increase of the CP content in the experimental diets.

Table 4.4.2. Chemical composition (g/kg dry matter) and *in vitro* digestibility (g/g) of diet ingredients.

	Ingredient						
	Barley grain	Wheat bran	Tomato	Cucumber	Sunflower meal	Cereal straw	Alfalfa hay
DM, g/kg fresh matter	897	856	61.5	37.0	911	902	899
g/kg dry matter							
OM	974	943	899	887	930	935	900
NDF	185	395	191	168	445	621	400
ADF	112	191	139	131	223	357	267
ADL	56.2	90.1	48.7	2.50	37.0	4.00	14.0
EE	22.1	34.4	38.8	13.0	7.00	10.9	14.8
CP	90.4	154	153	163	329	71.2	165
Condensed tannins							
Free			4.71	15.0			
Fiber-bound			4.47	20.6			
Protein-bound			1.73	15.0			
Total ¹			10.9	50.6			
<i>In vitro</i> digestibility							
DMD	0.81	0.68	0.91	0.97	0.62	0.40	0.62
OMD	0.82	0.67	0.91	0.98	0.61	0.38	0.60

¹Calculated as free + fiber-bound + protein-bound tannins.

Experiment 1. Batch Cultures of Mixed Rumen Microorganisms

The characteristics of fermentation promoted by control and experimental diets are shown in **Tables 4.4.3** and **4.4.4**.

The type of waste included in the experimental diet affected molar proportion of propionate ($P = 0.015$), the highest value being for diets including cucumber waste (**Table 4.4.4**), and acetate:propionate ratio ($P = 0.032$), corresponding the lowest value to diets including cucumber. The apparent ($P = 0.014$) and true ($P = 0.032$) DM digestibilities were also affected by the type of waste. The lowest apparent DM digestibility (0.26) was for diets including cucumber, while, the highest value of true DM digestibility (0.80) was found for diets including tomato-cucumber mixture. All the other studied parameters were not affected ($P \geq 0.076$) by the type of waste included in experimental diets. The level of waste in the diet only determined differences in valerate molar proportions, which decreased ($P = 0.023$) from inclusion of 15% of waste in diets; the rest of parameters were not affected ($P \geq 0.128$). No significant ($P \geq 0.069$) waste type x waste level interaction was observed for any of the considered parameters.

Gas production profiles were similar for control and experimental diets (**Figure 4.4.1**). The parameters defining the kinetics of gas production, gas production at the steady state ("A") and gas production rate constant ("c") were not affected by the kind of waste of its level of inclusion in diet (**Table 4.4.4**).

Table 4.4.3. Average values of pH, ammonia, gas production, volatile fatty acids (VFA) and molar proportions, acetic:propionic ratio and apparent and true DM and NDF digestibility obtained in batch cultures after 24 hours of experimental diets incubation.

	Diet ¹															
	Control	T1	T2	T3	T4	T5	C1	C2	C3	C4	C5	TC1	TC2	TC3	TC4	TC5
pH	6.66	6.70	6.70	6.72	6.71	6.71	6.73	6.74	6.73	6.72	6.73	6.74	6.71	6.73	6.72	6.69
Ammonia, mg/100 mL	22.1	22.5	22.1	20.4	24.2	24.8	20.9	19.9	20.6	19.6	18.6	19.7	19.4	18.3	20.8	19.0
A ² , mL	103.3	100.4	99.4	98.5	110.3	104.7	101.7	105.7	104.8	103.6	111.3	109.8	105.0	102.3	102.7	108.9
c ³ , h ⁻¹	0.078	0.079	0.086	0.096	0.105	0.107	0.084	0.090	0.093	0.101	0.103	0.090	0.090	0.095	0.103	0.118
mL gas/g DM incubated	172	166	168	174	198	189	174	184	184	186	199	191	183	180	186	200
mL gas/g DM really digested	226	215	221	228	266	247	226	235	249	246	283	246	229	230	234	242
VFA, mM	38.7	47.8	52.4	49.3	53.2	50.5	48.7	45.0	43.5	51.7	48.0	48.4	49.1	48.3	51.6	50.4
mol/100mol																
Acetate	63.1	63.5	65.2	66.6	65.1	65.8	66.2	64.7	65.2	65.0	63.6	64.1	65.9	66.6	65.5	66.1
Propionate	17.7	18.3	18.4	18.0	18.9	18.8	18.5	19.5	19.9	20.6	21.5	19.7	17.5	17.6	18.7	19.9
Iso-Butyrate	1.08	1.04	0.93	0.77	0.87	0.79	0.83	0.84	0.81	0.77	0.78	0.92	0.81	0.75	0.77	0.61
Butyrate	14.4	13.6	12.5	11.9	12.2	11.7	11.7	12.1	11.7	11.1	11.4	12.1	12.8	12.3	12.1	11.6
Iso-Valerate	1.76	1.77	1.51	1.36	1.54	1.46	1.26	1.38	1.32	1.24	1.31	1.48	1.42	1.36	1.39	1.09
Valerate	1.96	1.82	1.55	1.42	1.42	1.40	1.48	1.48	1.01	1.36	1.34	1.77	1.63	1.48	1.50	0.74
Acetate:propionate	3.56	3.48	3.55	3.70	3.45	3.50	3.59	3.35	3.30	3.18	3.01	3.29	3.78	3.80	3.51	3.33
Apparent DM digestibility, g/g	0.40	0.40	0.30	0.40	0.34	0.34	0.40	0.27	0.20	0.20	0.20	0.20	0.40	0.47	0.40	0.54
True DM digestibility, g/g	0.76	0.77	0.77	0.76	0.74	0.77	0.77	0.79	0.74	0.76	0.73	0.79	0.80	0.78	0.79	0.83
NDF digestibility, g/g	0.46	0.49	0.49	0.49	0.43	0.48	0.47	0.52	0.44	0.45	0.51	0.51	0.55	0.52	0.53	0.51

¹Control: diet including 25% barley grain, 5% wheat bran, 15% sunflower meal, 30% cereal straw and 22% alfalfa hay; T1, T2, T3, T4, T5: diets including 5, 10, 15, 20 and 25% of tomato wastes, respectively; C1, C2, C3, C4, C5: diets including 5, 10, 15, 20 and 25% of cucumber wastes, respectively; TC1, TC2, TC3, TC4, TC5: diets including 5, 10, 15, 20 and 25% of a tomato: cucumber wastes mixture (1:1), respectively. ²A: potential gas at the steady state. ³c: gas production rate.

Table 4.4.4. Effect of the type of waste and its level of inclusion in the diet on average values of pH, ammonia concentration, gas production, volatile fatty acids (VFA) production and molar proportions, acetic:propionic ratio and dry matter (DM) and neutral detergent fiber (NDF) digestibility obtained in batch cultures after 24 hours of diets incubation.

	Waste type										Waste level ¹					P-value				
	Control					Tomato + cucumber					0	1	2	3	4	5	SEM ²	WT ³	WL ⁴	WT×WL
	Tomato	Cucumber	Cucumber	Tomato + cucumber	Tomato + cucumber	0	1	2	3	4	5	SEM ²	WT ³	WL ⁴	WT×WL					
pH	6.66	6.71	6.73	6.72	6.72	6.66	6.72	6.72	6.73	6.72	6.71	0.006	0.304	0.947	0.972					
Ammonia, mg/100 mL	22.1	22.8	19.9	19.5	22.1	21.0	20.5	19.8	21.5	20.8	0.835	0.239	0.977	0.995						
A ⁵ , mL	103	103	105	106	103	104	103	102	106	108	1.48	0.658	0.716	0.880						
c ⁶ , h ⁻¹	0.078	0.094	0.094	0.099	0.078	0.084	0.089	0.095	0.103	0.109	0.004	0.885	0.421	0.999						
mL gas/g DM incubated	172	179	185	188	172	177	178	179	190	196	4.95	0.766	0.689	0.994						
mL gas/g DM really digested	226	235	248	236	226	229	228	236	249	257	7.47	0.757	0.693	0.971						
VFA, mM	38.7	50.6	47.4	49.6	38.7	48.3	48.8	47.0	52.2	49.6	0.643	0.133	0.174	0.860						
mol/100mol																				
Acetate	63.1	65.2	65.0	65.6	63.1	64.6	65.3	66.1	65.2	65.2	0.232	0.520	0.389	0.276						
Propionate	17.7 ^a	18.5 ^a	20.0 ^b	18.7 ^a	17.7	18.8	18.4	18.5	19.4	20.1	0.216	0.015	0.128	0.533						
Iso-Butyrate	1.08	0.88	0.81	0.77	1.08	0.93	0.86	0.78	0.80	0.73	0.039	0.534	0.546	0.995						
Butyrate	14.4	12.4	11.6	12.2	14.4	12.4	12.4	12.0	11.8	11.6	0.138	0.076	0.224	0.680						
Iso-Valerate	1.76	1.53	1.30	1.35	1.76	1.50	1.43	1.35	1.39	1.29	0.062	0.324	0.856	0.982						
Valerate	1.96	1.52	1.33	1.42	1.96 ^b	1.69 ^b	1.55 ^b	1.30 ^a	1.43 ^a	1.16 ^a	0.050	0.337	0.023	0.281						
Acetate:propionate	3.56 ^b	3.52 ^b	3.25 ^a	3.51 ^b	3.56	3.45	3.56	3.60	3.38	3.28	0.042	0.032	0.147	0.375						
Apparent DM digestibility, g/g	0.40 ^b	0.36 ^b	0.26 ^a	0.40 ^b	0.40	0.34	0.33	0.36	0.31	0.36	0.191	0.014	0.929	0.069						
True DM digestibility ⁷ , g/g	0.76 ^a	0.76 ^a	0.76 ^a	0.80 ^b	0.76	0.78	0.79	0.76	0.77	0.78	0.066	0.032	0.809	0.869						
NDF digestibility, g/g	0.46	0.47	0.48	0.52	0.46	0.49	0.52	0.48	0.47	0.50	0.122	0.229	0.759	0.966						

^{a-c}Within a row, means without a common superscript letter differ, $P \leq 0.05$ (LSD test).

¹Waste level: 0, 1, 2, 3, 4, 5: increasing levels of green-houses wastes inclusion in experimental diets (0, 5, 10, 15, 20 and 25% respectively).

²SEM: standard error of the mean, n= 48. ³WT: waste type. ⁴WL: waste level. ⁵A: potential gas at the steady state. ⁶c: gas production rate.

⁷Calculated as proposed by van Soest *et al.* (1966): $\text{true digested DM} = (\text{DM input} - \text{FND output})/\text{DM input}$, FND output being that analyzed in the residue after 24 h incubation.

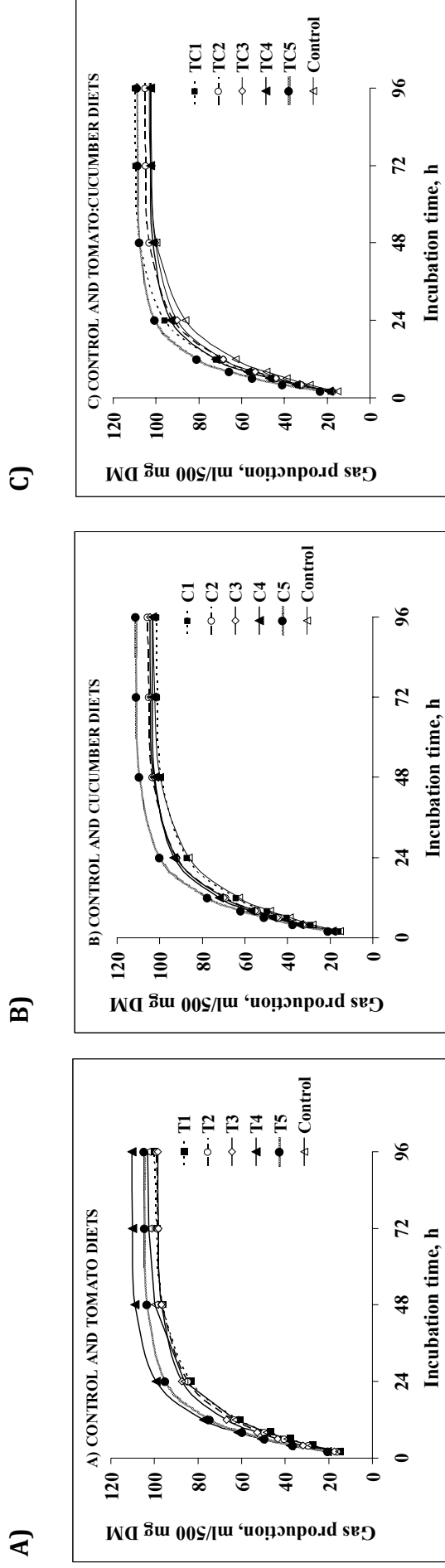


Figure 4.4.1. Gas production curves for control and diets including 5, 10, 15, 20 and 25% of **A) tomato** (T1, T2, T3, T4, T5), **B) cucumber** (C1, C2, C3, C4, C5) or **C) a tomato:cucumber mixture (1:1)** (TC1, TC2, TC3, TC4, TC5) incubated in batch cultures during 72 h. The gas production pattern was adjusted to the model: $y = A [1 - e^{-ct}]$ where y represents the cumulative gas production (mL); t , the incubation time (h); A , the asymptote (potential gas at the steady state; mL) and c , the gas production rate.

Experiment 2. Single-Flow Continuous-Culture Fermenters

The pH value in SFCCF (**Table 4.4.5**) was affected ($P = 0.029$) by the type of diet, with the lowest values for control (6.28) and TC5 (6.36) diets. Acetate molar proportion was higher ($P = 0.022$) for control and T5 diets (60.4 and 61.5 mol/100 mol, respectively) than for diets C5 and TC5 (57.3 and 57.9 mol/100 mol, respectively). Propionate molar proportion was lower ($P = 0.021$) for diet T5 compared with diets control, C5 or TC5. The *iso*-butyrate molar proportion was higher ($P = 0.002$) in fermenters fed diet control in comparison with experimental diets independently of waste type. On the contrary, the molar proportion of butyrate was lower ($P = 0.038$) for control diet in comparison with the experimental ones. *Iso*-valerate molar proportion was higher ($P = 0.004$) for control diet than for those including wastes. Acetate:propionate ratio was higher ($P = 0.009$) for T5 (3.31) than for the rest of the experimental diets. All the other studied parameters did not vary ($P \geq 0.064$) with the type of diet.

None of the studied parameters concerning N metabolism in SFCCF (**Table 4.4.6**) were affected ($P \geq 0.068$) by the type of diet.

Table 4.4.5. Average values of pH, volatile fatty acids (VFA) production and molar proportions, acetic:propionic ratios, carbohydrate digestibility, true organic matter (OM) digestibility and efficiency of VFA production in single-flow continuous-culture fermenters fed the experimental diets¹.

	Diet ¹				SEM ²	P-value
	Control	T5	C5	TC5		
pH	6.28 ^a	6.41 ^b	6.46 ^b	6.36 ^a	0.020	0.029
VFA, mmol/d mol/100 mol	111	111	102	108	2.03	0.388
Acetate	60.4 ^b	61.5 ^b	57.3 ^a	57.9 ^a	0.481	0.022
Propionate	20.7 ^b	18.6 ^a	21.9 ^b	21.1 ^b	0.335	0.021
<i>Iso</i> -butyrate	0.792 ^b	0.497 ^a	0.549 ^a	0.505 ^a	0.023	0.002
Butyrate	15.0 ^a	16.7 ^b	17.2 ^b	17.8 ^b	0.313	0.038
<i>Iso</i> -valerate	1.18 ^b	0.716 ^a	0.785 ^a	0.715 ^a	0.041	0.004
Valerate	1.89	1.92	2.20	2.00	0.041	0.066
Acetate:propionate	2.92 ^a	3.31 ^b	2.63 ^a	2.77 ^a	0.061	0.009
Carbohydrate digestibility ³ , g/g	0.70	0.71	0.56	0.57	0.263	0.111
True dietary OM digestibility, g/ g	0.39	0.37	0.45	0.41	0.397	0.887
VFA, mmol/g digested	7.17	7.30	8.81	8.90	0.272	0.064
VFA, mmol/g truly digested OM	11.4	11.6	10.8	11.4	1.17	0.996

^{a-c} Within a row, means without a common superscript letter differ, $P \leq 0.05$ (LSD test).

¹Control: diet including 25% barley grain, 5% wheat bran, 15% sunflower meal, 30% cereal straw and 22% alfalfa hay; T5: diet including 25% of tomato wastes; C5: diet including 25% of cucumber wastes; TC5: diet including 25% a tomato: cucumber wastes mixture (1:1).

²SEM: standard error of the mean, n=16.

Table 4.4.6. Average values of nitrogen flow and degradation, composition of effluent bacteria and bacterial growth and its efficiency in single-flow continuous-culture fermenters fed the experimental diets¹.

	Diet ¹				SEM ²	P-value
	Control	T5	C5	TC5		
N Flow, mg/d						
Total	673	663	611	682	25.0	0.735
NH ₃ -N	96.4	102	120	98.4	4.74	0.308
NAN ³	577	561	491	584	26.5	0.583
Dietary N degradation, %	78.2	79.3	84.1	77.8	2.33	0.743
Effluent bacteria						
DM, g/100 g freeze-dried matter	87.6	88.6	88.7	88.2	0.286	0.545
OM, g/100 g DM	72.7	72.5	72.0	71.2	0.501	0.687
N, g/100 g DM	62.4	62.4	65.2	62.5	0.720	0.442
Adenine, µmol/g DM	24.3	25.9	28.0	26.6	0.449	0.068
Guanine, µmol/g DM	26.2	28.5	30.4	28.7	0.579	0.122
Purine bases ⁴ , µmol/g DM	50.5	54.4	58.4	55.3	1.02	0.091
Purine bases:N, µmol/g DM	0.811	0.873	0.897	0.883	0.016	0.253
Bacterial N flow, mg/d	431	419	370	433	16.3	0.493
EBS ⁵ , mg of bacterial N/g of digested	27.6	27.6	32.0	35.7	1.57	0.226
EBS, mg of bacterial N/g of OM intake	15.5	16.0	14.2	16.7	0.615	0.525
EBS, mg of bacterial N/g of truly digested	44.0	43.7	41.1	48.8	5.57	0.964

¹Control: diet including 25% barley grain, 5% wheat bran, 15% sunflower meal, 30% cereal straw and 22% alfalfa hay; T5: diet including 25% of tomato wastes; C5: diet including 25% of cucumber wastes; TC5: diet including 25% a tomato: cucumber wastes mixture (1:1).

²SEM: standard error of the mean, n=16

³NAN: non-ammoniacal nitrogen.

⁴Calculated as adenine + guanine.

⁵EBS: efficiency of bacterial synthesis.

DISCUSSION

Alternative nutrients resources might be of interest to replace concentrates in animal feeding. Our hypothesis was that wastes from greenhouse horticulture might substitute barley grain in diets for ruminants without compromising ruminal fermentation and reducing feeding cost and environmental pollution as well. Tomato and cucumber are two vegetables produced abundantly in Andalusia, Spain, throughout the year. When prices are too low for producers, they are forced to withdraw part of the production from the market. These wastes also could offer an additional advantage based on the presence of polyphenols with potential healthy properties (Zhong *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2008; Guil-Guerrero and Reboloso-Fuentes, 2009). Although this fact would need more experimental evaluation, it has been already detected a proportion of dietary phenolics in milk (Besle *et al.*, 2004).

Chemical analyses of tomato and cucumber wastes exposed that main differences between barley grain and both fruits relied on a higher NSC and much lower CP content (reduction of 40 and 45% in barley in relation to tomato and cucumber, respectively) in barley grain. However, NDF contents were similar in barley, tomato and cucumber. Greater EE content in tomato than in barley and cucumber could be explained by the presence of pigments and seeds rich in fat in that vegetable as stated by Abdel-Rahman (1982). Besides, high presence of seeds in tomato was probably the reason of a much higher ADL content in relation to cucumber values. Some authors have found low OM digestibility in tomato fruits and tomato pomace as a consequence of high level of protein linked to ADF and low protein degradability (Fondevila *et al.*, 1994; Ventura *et al.*, 2009), but in our work tomato and cucumber OM digestibilities were slightly higher to values found in barley grain. Although protein linked to ADF was not determined in our work, we hypothesize that higher values of OM digestibility in our study were due to lower ADL values in relation to Ventura *et al.*, 2009 observations. Differences in chemical composition of vegetables are very likely to exist due to regional and varietal causes. Although high variability in wastes and by-products is an important drawback, the analyses of our samples carried out in different seasons

showed that chemical composition of these by-products is very stable throughout the year (data not shown).

To test the hypothesis that tomato and cucumber might be employed as a substitute of barley grain in diets for ruminants, two *in vitro* approaches were used: batch cultures and SFCCF. In batch cultures, it was studied the ruminal fermentation promoted by a control diet and 14 experimental diets in which 20, 40, 60, 80 or 100 % of barley grain was substituted with tomato or cucumber fruits or a mixture (1:1) of both. Batch cultures may provide information on the potential ruminal fermentation of carbohydrates but not much in terms of protein degradation (Broderick, 1978; Raab *et al.*, 1983). Thus, SFCCF were used to further study ruminal fermentation promoted by control and those experimental diets which replaced barley totally by tomato, cucumber or the mixture of both. These diets were chosen on the basis that there was no effect of waste level on most of the fermentative parameters in batch cultures experiment. This means that the employ of these experimental diets could allow a substantial reduction in feeding cost and an increase in wastes recycling.

Results obtained in batch cultures indicated no differences in most of the fermentation parameters among control and experimental diets. Total VFA concentration values obtained with experimental diets in this study were higher than those obtained with diets including citrus fruits in the rumen of sheep (Piquer *et al.*, 2009). Both tomato and cucumber fruits were higher in crude protein and fiber than citrus ones. Cucumber diets promoted higher propionate and lower acetate:propionate ratio, which might be because of lower NDF content in cucumber, compared to those in tomato or barley. However, higher production of propionate with cucumber diets did not have any effect on gas production. Differences between tomato and cucumber diets might also be due to the low protein degradability found in tomato fruits and pomace (Fondevila *et al.*, 1994; Ventura *et al.*, 2009). Ventura *et al.* attributed this low degradability to high protein levels linked to the cell walls, whose values would be remarked in fruits, like tomato, with important number of seeds. Additionally, inclusion of wastes in diet by 15% determined decreased valerate molar proportion in batch cultures. It is known that valerate can contribute positively to the growth of some cellulolytic

bacteria (Bryant, 1973). There is no information concerning gas production from diets including tomato or cucumber fruits in the literature. Our results showed that gas produced after 24 h of incubation ranged from 172 to 188 mL/g incubated DM for diets which included barley grain and tomato-cucumber mixture, respectively, and from 226 to 248 mL/g truly digested DM for control and diets including cucumber fruits, respectively. These values are similar to those found for silages (Blümmel *et al.*, 1999; Gierus *et al.*, 2008) but lower to values obtained with cereals or legumes (Carro and Ranilla, 2003; Maheri-Sis *et al.*, 2008).

Results obtained in SFCCF corroborate observations made in batch cultures concerning the lack of diet effect on total VFA production. Also, values found for VFA production were similar to those observed by Ariza *et al.* (2001) with diets including citrus pulp. However, while in batch cultures there was only an effect on propionate and a tendency for butyrate to be affected by diet, in SFCCF most VFA molar proportions were affected by diet. The best conditions for cellulolysis seem to be created by diets including tomato as higher acetate:propionate were obtained from its fermentation. Particular values of acetate, branched chain fatty acids (BCFA) and acetate:propionate ratio were higher in our experiment than in Ariza *et al.* (2001) work and propionate molar proportions were lower than those found by the mentioned authors. Ben Ghedalia *et al.* (1989) found no differences in total VFA in the rumen of sheep fed diets including citrus pulp and barley and divergences in the molar proportions of some particular acids. The VFA values found in the rumen of sheep by these authors were lower than those reported in the present work. In agreement with Ben-Ghedalia *et al.* (1989), our values for BCFA were higher for diets including barley than for those including tomato or cucumber wastes. *Iso*-butyrate and *iso*-valerate are VFA from some amino acid degradation (Wallace *et al.*, 1997) and were higher in fermenters fed the control diet in comparison with the experimental diets. Efficiency of VFA production varied from 7.17 to 8.90 mmol/g digested carbohydrate and were higher than values obtained with diets based on alfalfa hay and concentrate and feed blocks including olive cake, which ranged from 3.95 to 4.22 (Molina-Alcaide *et al.*, 2009b), but lower than values observed by Dann *et al.* (2006), who reported average

values of 11.8 mmoles VFA/g digested carbohydrate for corn, alfalfa silage and soybean meal based diets with without any supplementation.

The pH values were higher for diets including tomato or cucumber than those including barley grain in agreement with Ben-Ghedalia *et al.* (1989), whose pH values were higher in the rumen of sheep fed citrus pulp-diets than in animals receiving barley based diets.

Values found for ammonia concentration in fermenters were higher than those observed with diets including feeding blocks both in fermenters and in the rumen of goats by Molina-Alcaide *et al.* (2009b). Contrarily to our results Ben-Ghedalia *et al.* (1989) and Piquer *et al.* (2009) found lower ammonia concentration in the rumen of sheep fed diets including citrus pulp in comparison to diets including barley or wheat grain, respectively. Values in the present work were not different depending on the diet. The N metabolism related parameters for control and experimental diets did not differ, indicating that inclusion of different levels of tomato and cucumber instead of barley grain in ruminant diets did not seem to compromise N ruminal fermentation.

Ben Ghedalia *et al.* (1989) observed higher microbial N flow to the duodenum in sheep fed diets including citrus pulp than in those receiving barley-based diets while in our case no differences were detected among control (including barley) and experimental diets including tomato, cucumber or a mixture of both wastes. The N content in bacterial effluent pellets were similar to those reported in fermenters fed more fibrous diets like two-stage olive cake (Molina-Alcaide *et al.*, 2009a), though N flow was slightly higher than that found by those authors. The PB:N ratios in EB (0.81 to 0.90) were lower than values (1.05 to 1.26) obtained in single-flow continuous-culture fermenters fed diets including feed blocks (Molina-Alcaide *et al.*, 2009b). Changes in PB concentration have been associated with the presence of different bacterial species with different growth rates (Obispo and Dehority, 1999). That may be confirmed with results from the present work since similar PB content in EB from fermenters fed the control and experimental diets coincide with no differences found in the number of total bacteria, from q-PCR, and similar distribution in dendrograms, from t-RFLP, found for the same diets used in the present work by Soto *et al.* (unpublished results).

Efficiencies of bacterial protein synthesis were similar (41.1 to 48.8 vs 40.1 to 46.1 g bacterial N/kg truly digested OM) to those found by Molina-Alcaide *et al.* (2009b) Our values were lower than those obtained in ewes fed diets including soy-bean meal (108-114 g/kg truly digested OM) by Karsli *et al.* (2006) and higher than those found by Ariza *et al.* (2001) for diets including citrus pulp. A high variability in values for bacterial protein synthesis has been reported (Dann *et al.*, 2006; Cantalapiedra *et al.*, 2009) depending on different factors.

Conclusions

Substitution of barley grain with up to 100% with tomato, cucumber or a mixture of both wastes from greenhouse horticulture in diets for ruminants did not seem to compromise the ruminal fermentation indicating their potential to replace barley in ruminants feeding. Tomato or cucumber or a mixture of both could be used depending on their relative availability. Further research is needed to state the nutritive value of experimental diets *in vivo* and their possible added value for improving the quality of ruminant products. The inclusion of high-moisture by-products such as tomato (93.9 % of water) and cucumber (96.3% of water) wastes in ruminant diets is challenging but it might help to prevent environmental pollution.

LITERATURE CITED

- Abdel-Rahman, A. H. Y. 1982. The chemical constituents of tomato seeds. *Food Chem.* 9: 315-318.
- Aghajanzadeh-Golshani, A., N. Maheri-Sis, A. Mirzaei-Aghsaghali, and A. Baradaran-Hasanzadeh. 2010. Comparison of nutritional value of tomato pomace and brewer's grain for ruminants using *in vitro* gas production technique. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 5: 43-51.
- AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis*. 18th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Gaithersburg, MD.
- Ariza, P., A. Bach, M. D. Stern, and M. B. Hall. 2001. Effects of carbohydrates from citrus pulp and hominy feed on microbial fermentation in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 79: 2713-2718.
- Balcells, J., J. A. Guada, J. M. Peiró, and D. S. Parker. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 575: 153-157.
- Ben-Ghedalia, D., Edith-Josef, J. Miron, and Y. Est. 1989. The effects of starch- and pectin-rich diets on quantitative aspects of digestion in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 24: 289-298.
- Besle, J. M., J. L. Lamaison, P. Pradel, D. Fraisse, D. Viala, and B. Martin. 2004. Les flavonoides, des fourrages au lait. *Renc. Rech. Rumin.* 11: 67-70.
- Blümmel, M., R. Mgonezulu, X. B. Chen, H. P. S. Makkar, K. Becker, and E. R. Ørskov. 1999. The modification of an *in vitro* gas production test to detect roughage related differences in *in vivo* microbial protein synthesis as estimated by the excretion of purine derivatives. *J. Agric. Sci.* 133: 335-340.
- Broderick, G. A. 1987. Determination of protein degradation rates using a rumen *in vitro* system containing inhibitors of microbial nitrogen metabolism. *Br. J. Nutr.* 58: 463-475.
- Bryant, M. P. 1973. Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. Pages 1889-1913 in *Federation Proc.*
- Cantalapiedra-Hijar, G., D. R. Yáñez-Ruiz, A. I. Martín-García and E. Molina-Alcaide. 2009. Effects of forage:concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats. *J. Anim. Sci.* 87: 622-631.

- Carro, M. D., and M. J. Ranilla. 2003. Effect of the addition of malate on *in vitro* rumen fermentation of cereal grains. *Br. J. Nutr.* 89: 181-188.
- Dann, H. M., C. S. Ballard, R. J. Grant, K. W. Cotanch, M. P. Carter, and M. Suekawa. 2006. Effects of glutamate on microbial efficiency and metabolism in continuous culture of ruminal contents and on performance of mid-lactation dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 130: 204-224.
- Demeyer, D. I., and C. J. van Nevel. 1979. Effect of defaunation on the metabolism of rumen micro-organisms. *Br. J. Nutr.* 42: 515-524.
- Denek, N., and A. Can. 2006. Feeding value of wet tomato pomace ensiled with wheat straw and wheat grain for Awassi sheep. *Small Ruminant Res.* 65: 260-265.
- Doce, R. R., G. Hervás, A. Belenguer, P. G. Toral, F. J. Giráldez, and P. Frutos. 2009. Effect of the administration of young oak (*Quercus pyrenaica*) leaves to cattle on ruminal fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150: 75-85.
- FAO. 2010. World Food Situation. Food price indexes data. <http://www.fao.org/worldfoodsituation/FoodPricesIndex/en/>.
- Fondevila, M., J. A. Guada, J. Gasa, C. Castrillo. 1994. Tomato pomace as a protein supplement for growing lambs. *Small Ruminant Res.* 13: 117-126.
- Gierus, M., A. Schiborra, K. H. Südekum, G. Rave, and F. Taube. 2008. Comparison of gas accumulation profiles of several feeds using manual or automated gas production methods. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147: 310-325.
- Goering, M. K., and P. J. van Soest. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). *Agr. Handbook 379*. USDA - ARS. Washington, DC.
- Guil-Guerrero, J. L., and M. M. Reboloso-Fuentes. 2009. Nutrient composition and antioxidant activity of eight tomato (*Lycopersicon esculentum*) varieties. *J. Food Comp. Anal.* 22: 123-129.
- Isac, M. D., M. A. García, J. F. Aguilera, and E. Molina-Alcaide. 1994. A comparative study of nutrient digestibility, kinetics of digestion and passage and rumen fermentation pattern in goats and sheep offered medium quality forages at the maintenance level of feeding. *Arch. Anim. Nutr.* 46: 37-50.
- Karsli, M. A., T. Tasal, and H. Nursoy. 2006. Effect of dietary inclusion of hazelnut and soybean meals on microbial protein synthesis. *Small Ruminant Res.* 64: 180-185.

- Maheri-Sis, N., M. Chamani, A. A. Sadeghi, A. Mirza-Aghazadeh, and A. Aghajanzadeh-Golshani. 2008. Nutritional evaluation of *kabuli* and *desi* type chickpeas (*Cicer arietinum* L.) for ruminants using *in vitro* gas production technique. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 2946-2951.
- MARM. 2009. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Anuario de Estadística 2009.
http://www.mapa.es/estadistica/pags/anuario/2009/Anuario_2009.pdf
- McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43: 99-109.
- Miettinen, H., and J. Setälä. 1989. Design and development of a continuous culture system for studying rumen fermentation. *J. Agr. Sci. Finland.* 61: 463-473.
- Molina-Alcaide, E., A. Moumen, I. Martín-García, and M. D. Carro. 2009a. Comparison of bacterial pellets and microbial markers for the estimation of the microbial nitrogen and amino acids flows from single flow continuous culture fermenters fed diets containing two-stage olive cake. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 93: 527-537.
- Molina-Alcaide, E., M. R. Pascual, G. Cantalapiedra-Hijar, E. Y. Morales-García, and A. I. Martín-García. 2009b. Effects of concentrate replacement by feed blocks on ruminal fermentation and microbial growth in goats and single-flow continuous-culture fermenters. *J. Anim. Sci.* 87: 1321-1333.
- Obispo, N. E., and B. A. Dehority. 1999. Feasibility of using total purines as a marker for ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.* 77: 3084-3095.
- Ojeda, A., and N. Torrealba. 2001. Chemical characterization and digestibility of tomato processing residues in sheep. *Cuban J. Agr. Sci.* 35: 309-312.
- Pérez-Maldonado, R. A., and B. W. Norton. 1996. The effects of condensed tannins from *Desmodium intortum* and *Calliandra calothyrsus* on protein and carbohydrate digestion in sheep and goats. *Br. J. Nutr.* 76: 515-533.
- Piquer, O., L. Ródenas, C. Casado, E. Blas, and J. J. Pascual. 2009. Whole citrus fruits as an alternative to wheat grain or citrus pulp in sheep diet: Effect on the evolution of ruminal parameters. *Small Ruminant Res.* 83: 14-21.
- Prieto, C., J. F. Aguilera, L. Lara, and J. Fonollá. 1990. Protein and energy requirements for maintenance of indigenous Granadina goats. *Br. J. Nutr.* 63: 155-163.

- Raab, L., B. Cafantaris, T. Jilg, and K. H. Menke. 1983. Rumen protein degradation and biosynthesis. *Br. J. Nutr.* 50: 569-582.
- Rahman, A. H. M. M., M. Anisuzzaman, F. Ahmed, A. K. M. Rafiul-Islam, and A. T. M. Naderuzzaman. 2008. Study of nutritive value and medicinal uses of cultivated cucurbits. *J. Appl. Sci. Res.* 4: 555-558.
- Tapia, M. O., M. D. Stern, R. L. Koski, A. Bach, and M. J. Murphy. 2002. Effects of patulin on rumen microbial fermentation in continuous culture fermenters. *Anim. Feed Sci. Technol.* 97: 239-246.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48: 185-197.
- van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- van Soest, P. J., R. H. Wine, and L. A. Moore. 1966. Estimation of the true digestibility of forages by the *in vitro* digestion of cell walls. *Proc. Int. Grassl. Congr.* 10: 438-441.
- Vasta, V., A. Nudda, A. Cannas, M. Lanza, and A. Priolo. 2008. Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147: 223-246.
- Ventura, M. R., M. C. Pieltain, and J. I. R. Castanon. 2009. Evaluation of tomato crop by-products as feed for goats. *Anim. Feed Sci. Technol.* 154: 271-275.
- Wallace, R. J., R. Onodera, and M. A. Cotta. 1997. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: P. N. H. a. C. S. Stewart (ed.) *The rumen microbial ecosystem*. p 283-328. Chapman and Hall, London, UK.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39: 971-974.
- Zhong, Y., M. A. Khan, and F. Shahidi. 2007. Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). *J. Agricult. Food Chem.* 55: 1188-1192.

Capítulo 5

Discusión general

Tanto las dificultades como las potenciales fuentes de variación son diferentes cuando se realizan ensayos *in vivo* o *in vitro*. El principal inconveniente de los estudios *in vivo*, en relación a la fermentación ruminal, estriba en la variabilidad del contenido ruminal entre animales, de la misma o de distintas especies, lo cual limita la extrapolación de los resultados a condiciones diferentes a aquellas en que se realiza un determinado experimento. Diversos autores han puesto de manifiesto que la microbiota que se desarrolla en el rumen de animales de la misma especie es individualmente diferente; sin embargo, la información a este respecto es muy limitada y procede, principalmente, de vacuno y ovino (Galbraith *et al.*, 2004; Regensbogenova *et al.*, 2004; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2009; 2010). Dicha variabilidad tiene una repercusión importante en la utilización digestiva de la dieta y los parámetros fermentativos obtenidos con distintos animales (Hernandez-Sanabria *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2009, 2010).

En el caso de los experimentos *in vitro*, la principal dificultad es su limitada capacidad para simular las condiciones del ambiente ruminal y lograr que los resultados obtenidos, con este tipo de ensayos, sean extrapolables a los que se obtendrían *in vivo*. Establecer las diferencias o semejanzas en la composición de la microbiota que se desarrolla en el rumen del animal y en cualquier sistema *in vitro*, requiere de estudios comparativos. En general, los trabajos que comparan las poblaciones microbianas ruminales *in vivo* e *in vitro* son escasos, existiendo unos pocos realizados con sistemas renovados de flujo continuo y semi-continuo (Mansfield *et al.*, 1995; Ziemer *et al.*, 2000; Cantalapiedra-Hijar, 2009; Muetzel *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2010b) y con sistemas no renovados (Gizzi *et al.*, 1998; Muetzel *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008). Las diferencias que existen entre los distintos sistemas de simulación (Carro *et al.*, 2009) así como las constatadas a nivel de la fermentación ruminal entre diferentes especies de rumiantes (Prigge *et al.*, 1984; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2004a, b), indican que los resultados obtenidos con un tipo de fermentador y especie animal no deberían ser extrapolados a otras circunstancias. En el presente trabajo de tesis doctoral se ha abordado el estudio de la variabilidad en la composición del ecosistema ruminal en cabras (**experimento 1**) así como de la evolución de las poblaciones microbianas en

diferentes sistemas *in vitro*, a los que se suministraron dietas también de diferente calidad (**experimentos 2, 3, 4 y 5**).

5.1. VARIABILIDAD INDIVIDUAL DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS RUMINALES

Los resultados de la **publicación 1** mostraron que la estructura de las poblaciones bacterianas de cabras, pertenecientes a un mismo rebaño, era marcadamente diferente en los distintos individuos. Además, tal como muestra el dendrograma obtenido tras llevar a cabo el intercambio de contenido ruminal entre animales (**Figura 4.1.2 de la publicación 1**), la impronta del animal en las poblaciones de bacterias ruminales es lo suficientemente potente como para que incluso tras introducir una fracción de contenido ruminal de otro individuo, la comunidad bacteriana ruminal del animal que lo recibe siga manteniendo su propia idiosincrasia pasado un tiempo muy corto.

En un experimento similar, en el que se llevó a cabo el intercambio de contenidos ruminales entre distintas vacas, Weimer *et al.* (2010) también observaron un restablecimiento total o parcial de las poblaciones bacterianas originales del hospedador después de un cierto periodo de tiempo, variable según el animal, tras el intercambio. Estos autores sugieren que la microbiota indígena de un animal es muy resistente a ser desplazada por microorganismos del ecosistema ruminal de otro animal. La microbiota foránea debe superar determinadas barreras ecológicas e inmunológicas para llegar a establecerse en el rumen de un animal distinto a su hospedador original.

Diversos factores pueden estar implicados en la adquisición, por el animal neonato, de una microbiota ruminal específica. El tracto gastrointestinal de los mamíferos es colonizado por los microorganismos presentes en la vagina y en las heces de la madre durante el momento del parto y, posteriormente, por los microorganismos presentes en la leche materna (Collins y Gibson, 1999). Ello implica que la madre ejerce un efecto determinante en la variabilidad de la microbiota. Además, la dieta recibida por el animal tras el destete puede afectar a las poblaciones microbianas que se establecen, posteriormente, en el rumen

(Pounden y Hibbs, 1948; Eadie *et al.*, 1959). Trabajos recientes han mostrado que las diferencias en la estructura de las poblaciones bacterianas, debidas a la dieta recibida por el animal en edad temprana, pueden perdurar en el animal adulto, abriéndose la posibilidad de predeterminar la microbiota que se establecería en un animal mediante el control de la dieta recibida por el mismo tras el destete (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2010).

Existe una estrecha relación entre la microbiota ruminal y el animal hospedador. Las diferencias individuales se observan incluso entre animales de un mismo rebaño, habitualmente en contacto directo entre ellos. La microbiota indígena de cada animal es muy resistente a ser desplazada por microorganismos procedentes de otro animal. En un futuro, sería interesante llevar a cabo estudios más profundos que analicen los factores genéticos y ambientales determinantes de la especificidad de la microbiota ruminal en cada individuo, con objeto de sugerir herramientas que permitan manipularlos para obtener un beneficio productivo o cualitativo. **La especificidad microbiota-hospedador, demostrada en este trabajo, y la estrecha relación puesta de manifiesto entre la composición microbiana y la capacidad digestiva del rumiante (Zhou *et al.*, 2010), ponen de manifiesto la importancia del uso de técnicas *in vitro* para disminuir la alta variabilidad que los experimentos *in vivo* acarrearán.**

5.2. EVALUACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS EN ESTUDIOS CON SISTEMAS *IN VITRO*

5.2.1. Impacto del procesado y trasvase del contenido del rumen a un sistema *in vitro* sobre la microbiota ruminal

Cuando se lleva a cabo el trasvase de contenido ruminal desde el animal hasta un sistema de incubación *in vitro*, los microorganismos han de hacer frente a una serie de alteraciones en el medio, que suponen un estrés para su supervivencia y crecimiento. Durante la extracción del contenido ruminal, el filtrado del mismo para preparar el inóculo y su introducción en el sistema *in vitro*, factores como el cambio de temperatura y la exposición al oxígeno inciden negativamente sobre la

microbiota ruminal. Todo ello puede conducir a una pérdida de la biomasa microbiana. Por otra parte, la filtración elimina la fracción sólida de la digesta ruminal, con mayor cantidad de microorganismos que la fracción líquida. El consorcio microbiano adherido a las partículas sólidas presenta mayor biodiversidad (Tajima *et al.*, 1999; Larue *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2010) y densidades poblacionales (Forsberg y Lam, 1977; Craig *et al.*, 1987; Minato *et al.*, 1993) que otros compartimentos ruminales.

Los resultados del **experimento 2** muestran un importante descenso de todas las poblaciones microbianas consideradas (bacterias, arqueas, hongos y 2 especies celulolíticas) así como un cambio en la estructura de la comunidad bacteriana del contenido ruminal, tras ser filtrado e incubado durante un día en el sistema *in vitro*, con respecto al contenido ruminal íntegro. Esto cambios son indicio de la importante pérdida de biomasa microbiana debida al proceso de filtración. No obstante, los valores de biodiversidad bacteriana (índice de Shannon) y de homogeneidad, encontrados en los FFCS un día tras su inoculación, no difirieron de los encontrados en el rumen. Puesto que la fracción sólida de la digesta es la que soporta más microorganismos adheridos, el hecho de no encontrar diferencias en los valores de diversidad entre el contenido ruminal y el líquido filtrado podría deberse a sesgos provocados por las técnicas de análisis empleadas. Las técnicas DGGE y T-RFLP, utilizadas en estudios de biodiversidad microbiana, tienen una capacidad de resolución y prospectiva limitadas (Fromin *et al.*, 2002; Schütte *et al.*, 2008), siendo incapaces de resolver todos los filotipos presentes en ecosistemas tan complejos como es el rumen. Por otro lado, se sabe que las poblaciones de microorganismos menos abundantes contribuyen, en gran medida, a la diversidad de un ecosistema (Blackwood *et al.*, 2007) aunque son difícilmente detectables mediante las técnicas mencionadas. Cantalapedra-Hijar (2009) tampoco encuentra diferencias entre los índices de diversidad bacteriana obtenidos en contenido ruminal y en FFCS. Estos resultados muestran que, en términos de especies mayoritarias, los FFCS tienen el potencial de mantener una biodiversidad bacteriana similar a la encontrada en el rumen.

Constatado el hecho de que una buena parte de microorganismos se pierde como consecuencia de la filtración del contenido ruminal, en los **experimentos 4 y 5** se

tomaron alícuotas de las fracciones sólida y líquida del contenido ruminal, tras ser filtrado, para evaluar, mediante RT-qPCR, los niveles de microorganismos asociados a cada una de esas fracciones. La **Figura 5.1** muestra la cantidad de microorganismos de cada uno de los grupos mencionados anteriormente que estaban ligados a las fases sólida y líquida del contenido ruminal.

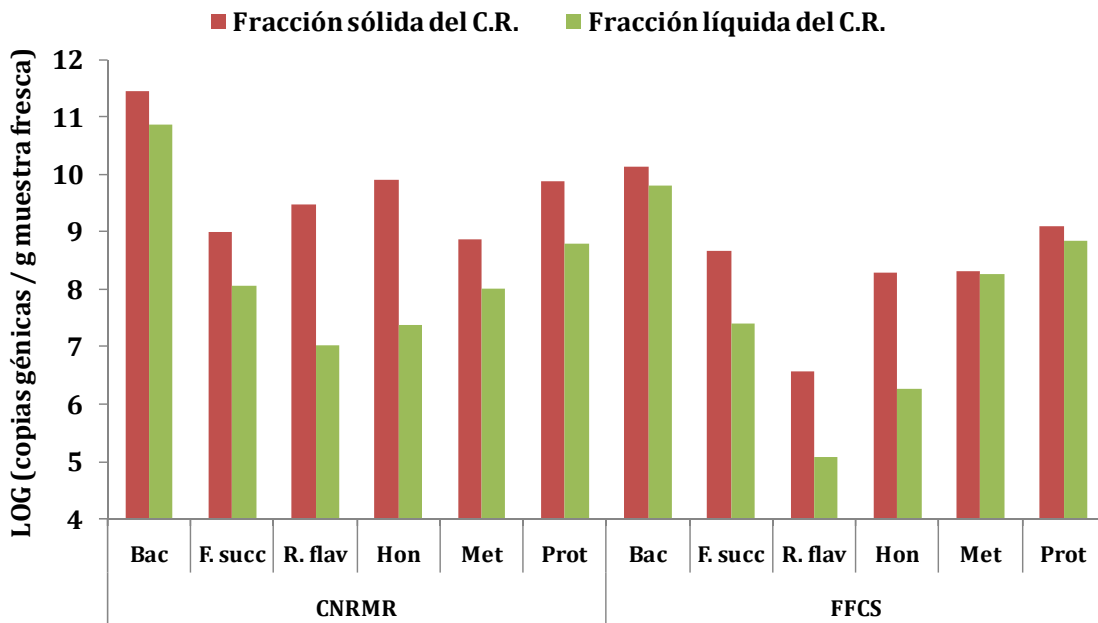


Figura 5.1. Abundancias de bacterias (Bac), *Fibrobacter succinogenes* (*F. succ*), *Ruminococcus flavefaciens* (*R.flav*), hongos (Hon), arqueas metanogénicas (Met) y protozoos (Prot) en las fracciones sólida y líquida de muestras del contenido ruminal de caprino, utilizadas para obtener los inóculos empleados en cultivos no renovados de microorganismos ruminales (CNRMR) y en fermentadores de flujo continuo simple (FFCS).

Las abundancias de todos los microorganismos considerados eran superiores en la fracción sólida de la digesta que en la líquida. Los valores medios de bacterias en la fracción sólida de la digesta fueron de $1,48 \times 10^{11}$ copias del gen *rss* /g materia fresca, valores muy similares a los encontrados por otros autores (Shinkai y Kobayashi, 2007) con dietas que incluían un heno diferente al empleado en nuestro trabajo. Las densidades de todos los microorganismos estudiados fueron mayores en el inóculo empleado en los CNRMR que en el que se usó para inocular los FFCS. Además, las abundancias relativas de las bacterias celulolíticas eran diferentes según el inóculo considerado. Así, en las fracciones de la digesta ruminal

de los animales donantes del inóculo para el experimento realizado con CNRMR, la población de *R. flavefaciens* presentaba una densidad mayor que la de *F. succinogenes* mientras que la digesta ruminal de los donadores del inóculo empleado en los FFSC presentaba una mayor abundancia de *F. succinogenes* que de *R. flavefaciens*. La mayoría de los trabajos, realizados *in vivo*, que se centran en el estudio de los microorganismos celulolíticos, muestran una mayor abundancia de *F. succinogenes* que de *R. flavefaciens* (Kobayashi *et al.*, 2008). No obstante, algunos autores han encontrado densidades superiores de *R. flavefaciens* (Mosoni *et al.*, 2007) y otros autores han encontrado valores similares de *F. succinogenes* y de ruminococos (*R. flavefaciens* y *R. albus*) o, incluso, niveles superiores de *R. albus* que de los otros microorganismos celulolíticos (Krause *et al.*, 1999; Weimer *et al.*, 1999). Las diferencias en la predominancia de unas u otras especies de microorganismos celulolíticos, observadas en los distintos estudios, se han atribuido, en muchos casos, a la dieta empleada. Sin embargo, en los **ensayos 4 y 5**, en los que los animales recibían la misma dieta, la causa más probable de las diferencias podría ser la variabilidad entre individuos (van Glyswyk, 1970; Weimer *et al.*, 1999).

Una vez constatados tanto la importante pérdida de biomasa microbiana como los cambios en la composición bacteriana que provoca la filtración del contenido ruminal, cabe cuestionarse si se ha de modificar el procesado del contenido ruminal para la obtención de inóculos a emplear en los sistemas *in vitro*. El empleo de contenido ruminal íntegro, como inóculo de sistemas *in vitro*, plantea ciertos inconvenientes, como se comentó anteriormente. En primer lugar, se entorpecería, en gran medida, el paso de la digesta a través de los orificios de salida de los FFCS ya que estos sistemas, a diferencia de lo que ocurre en el rumen, no disponen de ningún mecanismo que pueda propulsar hacia fuera el contenido ruminal degradado. Además, habría de tenerse en cuenta el importante efecto de la gran cantidad de material sólido que se introduce en el sistema *in vitro*. El enriquecimiento del contenido ruminal filtrado con bacterias de la fase sólida no siempre mejora las tasas de degradación y/o fermentación del alimento (Craig *et al.*, 1984; Pell y Schofield, 1993; Rymer *et al.*, 1999). La eficacia de cualquier procedimiento depende, en gran medida, de la rapidez con que se lleve a cabo,

puesto que los microorganismos ruminales son sensibles al oxígeno. Las arqueas y los hongos del rumen son especialmente sensibles a una atmósfera oxidativa (Orpin y Joblin, 1997; Stewart *et al.*, 1997). Los protozoos no parecen afectarse mucho por la exposición al oxígeno durante periodos de tiempo cortos (Sylvester *et al.*, 2004), probablemente por tener un cierto carácter aerotolerante (Williams, 1986) pero pueden lisarse con el uso de procedimientos como el mezclado del contenido ruminal en batidora (Craig *et al.*, 1984).

Otra posible mejora en la biomasa de las poblaciones bacterianas, presentes en la fracción líquida, podría alcanzarse optimizando el momento de toma de muestra del contenido ruminal. Diversos autores observaron variaciones en las concentraciones bacterianas del contenido ruminal, que se asocian al patrón de ingestión del alimento (Warner, 1966 a, b; Bryant y Robinson, 1968; Leedle *et al.*, 1982). En las primeras horas tras la administración de alimento, se produce un descenso marcado de la concentración bacteriana en el líquido debido al efecto de dilución de la comida, agua y saliva, que llegan al rumen y, también, a la rápida adhesión bacteriana a las partículas del alimento (Koike *et al.*, 2003a). Por otra parte, la acidificación del contenido ruminal tras la alimentación puede condicionar un cierto retraso en el crecimiento de microorganismos celulolíticos (Weimer *et al.*, 1999). Tras la ingestión de alimentos, las bacterias se multiplican y su concentración aumenta progresivamente hasta alcanzar valores máximos después de varias horas. Además, a medida que la masa microbiana aumenta y los sustratos a degradar descienden, aumenta también la proporción de bacterias libres en el líquido ruminal (Russell *et al.*, 2009). Parece pues que, *a priori*, existe una mayor probabilidad de recoger bacterias desligadas de los sólidos cuanto más se aleje el muestreo de digesta ruminal del momento en que se suministra el alimento al animal. No obstante, también habría de tenerse en cuenta que las bacterias libres en la fase líquida del contenido ruminal tendrían mayores posibilidades de ser arrastradas hacia el abomaso. De hecho, se considera que el tiempo de residencia en rumen de las bacterias no adheridas a sólidos es de 24 horas o menor (Hungate, 1966). Sería necesario monitorizar diversas poblaciones microbianas del contenido ruminal para evaluar el momento óptimo de su muestreo.

El procesado del contenido del rumen produjo una disminución muy significativa de las densidades de todos los microorganismos considerados. Sin embargo, los valores de diversidad y de homogeneidad bacteriana en el rumen y en fermentadores eran similares, lo que indica que el tipo de procesado a que se somete el contenido ruminal para preparar inóculos mantiene, al menos, las especies bacterianas mayoritarias en FFCS.

5.2.2. Duración del periodo de adaptación en los sistemas *in vitro*

La etapa inicial de establecimiento de la comunidad microbiana en un sistema *in vitro* puede ser crítica, requiriéndose varios días para alcanzar el equilibrio en el que la densidad de las distintas poblaciones microbianas y la cantidad de productos de la fermentación se estabilizan. En los cultivos no renovados, el agotamiento de los sustratos así como la acumulación de productos de la fermentación, conducen a un rápido declive de las poblaciones microbianas (Warner, 1956; López, 2005). No obstante, puesto que estos sistemas se utilizan para la determinación de la degradabilidad, de la digestibilidad o la producción de gas, el objetivo puede conseguirse en un corto periodo de tiempo y sin que se requiera una adaptación previa del sistema.

Los sistemas de cultivos renovados (fermentadores) simulan mejor la fermentación ruminal que los sistemas no renovados por lo que se emplean para estudios más complejos. Sin embargo, las condiciones en el interior del frasco de fermentación, incluso en los sistemas más complejos, nunca son exactamente iguales a las del rumen. Así, el ambiente del sistema *in vitro*, en el que no se retiran los productos de la fermentación o la retirada se realiza a velocidades diferentes de las fisiológicas, puede condicionar la actividad metabólica de los microorganismos y su abundancia y diversidad. Por otra parte, no es posible el establecimiento de un consorcio microbiano como el que está asociado a la pared del rumen. Establecer la duración óptima del periodo de adaptación de las comunidades microbianas a las condiciones del sistema *in vitro* es un aspecto metodológico importante, y a tener en cuenta, puesto que indica el momento adecuado para realizar el muestreo del contenido de los frascos de incubación, cuando se supone que las fluctuaciones de

las poblaciones microbianas solo se deben a los factores que se pretenden evaluar en el experimento. Algunos trabajos han monitorizado la fermentación ruminal y las poblaciones microbianas durante los primeros días de incubación en distintos tipos de fermentadores (Slyter y Putnam, 1967; Prevot *et al.*, 1994; Ziemer *et al.*, 2000; Cardozo *et al.*, 2004; Busquet *et al.*, 2005; Castillejos *et al.*, 2005, 2007; Muetzel *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, en prensa). Los trabajos que estudian la dinámica de las poblaciones durante los primeros días de adaptación al sistema *in vitro* muestran discrepancias (Slyter y Putnam, 1967; Prevot *et al.*, 1994; Ziemer *et al.*, 2000; Muetzel *et al.*, 2009). Ninguno de los trabajos mencionados se ha realizado con fermentadores de flujo continuo simple ni ha utilizado inóculo ruminal de caprino. Es por ello que el objetivo principal del **experimento 2** era determinar la idoneidad de la duración, habitualmente empleada en nuestro laboratorio, del periodo de adaptación de los experimentos con FFCS.

Los resultados del **experimento 2** mostraron que las poblaciones de bacterias, celulolíticas, hongos y metanogénicas no experimentaron cambios en su densidad a lo largo de 7 días de incubación en los FFCS, tiempo establecido como adecuado en otras publicaciones de nuestro grupo (Molina-Alcaide *et al.*, 1996, 2009a, 2009b; Martín-García *et al.*, 2006; Moumen *et al.*, 2008; Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2011). Puesto que parece que un periodo de adaptación de 7 días era lo suficientemente largo como para permitir la adaptación del ecosistema, en el **experimento 5** de esta tesis, también realizado con FFCS, se redujo el tiempo de adaptación a 4 días. Los resultados de este experimento concernientes a las poblaciones microbianas, mostraron ciertos cambios en las densidades de algunos microorganismos tras 4 días de incubación: mientras que la comunidad de bacterias totales no experimentaba ningún cambio significativo, los organismos fibrolíticos (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* y hongos) sí aumentaban en número y las abundancias de arqueas metanogénicas y de protozoos disminuían en el mismo periodo de tiempo. Las divergencias entre los resultados obtenidos en los **experimentos 2 y 5** podrían deberse a las características intrínsecas del inóculo ruminal empleado. Los animales donantes de inóculo utilizados en el **experimento 2**, se alimentaron con la misma dieta que recibían los fermentadores. Por el contrario, en el **experimento 5**, los fermentadores recibían dietas completamente

diferentes a las que se suministraban a los animales. Si en el **experimento 2** la microbiota inoculada en los fermentadores podría estar ya adaptada a la dieta, en el **experimento 5**, la microbiota inoculada debía adaptarse, no solo a las condiciones del sistema *in vitro*, sino también al cambio de una dieta basada en forraje a una mezcla de heno, paja, grano, subproductos, etc. Parece que existe una relación entre la composición de la dieta y la duración del periodo de adaptación, que es mayor cuanto menor sea la calidad de dicha dieta (Czerkawski y Breckenridge, 1977, 1979).

La diversidad y estructura de las poblaciones bacterianas en los frascos de fermentación de los FFCS no sufrió cambios significativos a lo largo de los 7 y 4 días de incubación (**experimentos 2 y 5**, respectivamente), indicando que las condiciones de incubación no incidieron negativamente sobre las especies bacterianas inoculadas en ambos experimentos.

La duración del periodo de adaptación en fermentadores podría estar influenciada, en gran medida, por la dieta que los animales donantes del inóculo reciben. En estudios con fermentadores inoculados con líquido ruminal de animales que consumen las mismas dietas que reciben los fermentadores, los tiempos de adaptación podrían reducirse. En cualquier caso, los FFCS son capaces de mantener valores de biodiversidad y composición bacteriana relativamente estables a lo largo del periodo de adaptación.

5.2.3. Evolución de las poblaciones microbianas en sistemas *in vitro* basados en cultivos renovados y no renovados de microorganismos ruminales

Estudios realizados en FFCS han mostrado que la estructura de las poblaciones bacterianas del contenido ruminal y la de aquellas que se desarrollan en FFCS es diferente (Cantalapiedra-Hijar, 2009). Los resultados del **experimento 2** de la presente Memoria muestran que las abundancias de todas las poblaciones consideradas (bacterias totales y celulolíticas, hongos y arqueas) así como la composición bacteriana del contenido ruminal y del contenido de los fermentadores eran diferentes. Puesto que el filtrado del contenido ruminal

elimina las partículas sólidas del mismo, es razonable pensar que los sistemas *in vitro* presenten una microbiota más similar a aquella que se desarrolla en el compartimento líquido del rumen. En la literatura solo existe un trabajo en el que se estudia la evolución de la microbiota del líquido ruminal de vacuno tras varios días de incubación en fermentadores de flujo continuo doble (Ziemer *et al.*, 2000) y, algunos trabajos que monitorizan la evolución de las poblaciones microbianas en CNRMR, incubando dietas de diferente calidad (Muetzel *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008). Hasta donde alcanza nuestro conocimiento no existe, en la actualidad, ningún trabajo que evalúe la estructura de las poblaciones bacterianas en sistemas continuos o discontinuos.

Los **experimentos 3, 4 y 5** mostraron diferencias en el comportamiento de las poblaciones microbianas en distintos sistemas de incubación (incubador ANKOM Daisy^{II}, CNRMR y FFCS). En sistemas no renovados (**experimento 4**, CNRMR), se observa que las poblaciones de bacterias totales, arqueas metanogénicas y protozoos no cambian tras 24 horas de incubación, mientras que las de los microorganismos fibrolíticos (hongos, *F. succinogenes* y *R. flavefaciens*) aumentan. Tras 48 de incubación (**experimento 3**, incubador Daisy^{II}), las poblaciones de bacterias totales y organismos fibrolíticos descienden significativamente, y los protozoos muestran una tendencia a la disminución. A las 72 de incubación, en CNRMR, todas las poblaciones microbianas disminuyen. Los resultados de los **experimentos 3 y 4** sugieren un cierto retraso en el descenso de las poblaciones de arqueas metanogénicas, ya que se observa un aumento a las 48 horas en el digestor ANKOM Daisy^{II} así como un descenso menos marcado que el experimentado por el resto de grupos microbianos, en los CNRMR, a las 72 horas. El agotamiento de sustratos, a partir de las 24 horas de incubación, marca el declive en la abundancia de la mayor parte de los microorganismos considerados. Se considera que el tiempo óptimo de incubación para la determinación gravimétrica de la digestibilidad es de 48 horas (López, 2005). Los resultados del **experimento 3** muestran que, a las 48 horas de incubación, las densidades microbianas son claramente inferiores a las existentes en el momento de la inoculación, lo que refleja el agotamiento del sustrato. Los protozoos y las arqueas metanogénicas, predadores de bacterias y utilizadores del H₂ liberado por otros

microorganismos, respectivamente, no muestran los mismos patrones de evolución que las bacterias totales y celulolíticas o que los hongos ni en el sistema Daisy^{II} ni en los CNRMR.

En el **experimento 5**, se observó un aumento en las poblaciones de microorganismos fibrolíticos tras 4 días de incubación en FFCS y una disminución en las de arqueas metanogénicas y protozoos. El descenso de protozoos en fermentadores es un hecho constatado en numerosos trabajos (Slyter y Putnam, 1967; Hoover *et al.*, 1976a; Hannah *et al.*, 1986; Mansfield *et al.*, 1995; Moumen *et al.*, 2009; Muetzel *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2010b). No obstante, la literatura presenta importantes divergencias en lo que respecta a los cambios experimentados por las poblaciones de bacterias, microorganismos fibrolíticos, hongos y arqueas en fermentadores, con respecto a las que existen en el contenido del rumen. Ziemer *et al.* (2000) compararon las poblaciones presentes en el filtrado del contenido ruminal original y tras varios días de incubación en FFC doble, observando un incremento de las abundancias relativas de arqueas (expresadas como porcentaje del ARNr de estos microorganismos con respecto al ARNr total) tras 7 días de incubación. En otro experimento observaron una disminución de las abundancias de estos microorganismos tras 10 días de incubación. Sin embargo, en ninguno de los dos experimentos mencionados se observaron cambios en las abundancias relativas de *Fibrobacter sp.* Es difícil establecer un paralelismo o divergencia entre nuestros resultados y los trabajos mencionados debido tanto a la forma de expresión de las abundancias (absoluta vs relativa) como a los inconvenientes asociados al empleo de ARNr como marcador. El contenido de ARNr en una misma célula es variable, en función de la fase de crecimiento en que se encuentre dicha célula (Zoetendal *et al.*, 2004), mientras que el número de copias de ADNr, de una determinada especie, es constante en el caso de bacterias, aunque probablemente no lo sea en el caso de protozoos (Firkins y Zu, 2006).

Los cambios en la diversidad y composición bacterianas, debidos a la incubación en los sistemas *in vitro*, difieren entre cultivos renovados y no renovados. En el incubador ANKOM Daisy^{II} y en los CNRMR, tras 48 y 24 horas de incubación, respectivamente, se observa una importante pérdida de determinados filotipos

bacterianos, tal como evidencian los gráficos de porcentajes de picos (**Figura 4.3.2** de la **publicación 3**), mientras que, en los FFCS, la composición y biodiversidad bacterianas del medio de incubación, tras 4 días de incubación, no difería mucho de la del inóculo utilizado. La biodiversidad y estructura de las poblaciones bacterianas en efluentes eran similares a las del contenido de los fermentadores. Estos resultados muestran que en los sistemas no renovados, tiempos cortos de incubación así como el agotamiento de sustratos implican la imposibilidad de alcanzar un adecuado crecimiento microbiano. Aquellas especies con menores densidades relativas en el conjunto de la comunidad microbiana ruminal podrían, por tanto, desaparecer por completo o descender a niveles tan bajos que las hicieran indetectables por medio de las técnicas de DGGE y T-RFLP.

Los sistemas no renovados tienen una capacidad limitada para mantener las poblaciones microbianas durante un tiempo de incubación de unos pocos días. A pesar de ello, se observan niveles adecuados de bacterias totales y celulolíticas, protozoos, hongos y arqueas a las 24 de incubación en CNRMR. Los sistemas renovados, debido a la entrada continua de sustratos y salida de productos de la fermentación, permiten un crecimiento adecuado de la microbiota ruminal, así como la presencia de una comunidad bacteriana muy similar a la del líquido ruminal.

5.3. EFECTO DE LA DIETA SUMINISTRADA AL SISTEMA *IN VITRO* SOBRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS

El efecto de la dieta que se suministra a los sistemas *in vitro* sobre las poblaciones microbianas desarrolladas en los mismos ha sido poco estudiado, limitándose a dietas convencionales, basadas en heno de alfalfa o de hierba y concentrado en distintas proporciones (Cantalapiedra-Hijar, 2009; Martínez *et al.*, 2010b). La mayor parte de los trabajos que estudian el efecto de la dieta se han realizado *in vivo*.

En el **experimento 2**, ninguno de los grupos microbianos estudiados (bacterias, hongos y protozoos totales, *F. succinogenes* y *R. flavefaciens*) mostró cambios en las abundancias debidos a la dieta recibida (LC ó HC). Ambas dietas diferían

principalmente en el contenido en la fracción fibrosa (**Tabla 4.2.1 de la publicación 2**), superior en la dieta LC que en la HC, pero las poblaciones de microorganismos fibrolíticos no resultaron afectadas por el tipo de dieta. Cantalapiedra-Hijar (2009) tampoco observa un efecto de la relación forraje:concentrado sobre las poblaciones de bacterias totales en FFCS. Tampoco en el **experimento 5** del presente trabajo, la mayor parte de los microorganismos estudiados (bacterias totales, *F. succinogenes*, hongos totales, arqueas totales y protozoos totales) resultaron afectados. Solo las poblaciones de *R. flavefaciens* eran significativamente inferiores con la dieta que contenía TO100, en comparación con las otras dietas (**Tabla 5.1 de la discusión**). Las principales diferencias en la composición química (**Tabla 4.4.2 de la publicación 4**) de las dietas control y experimentales (TO100, CU100, TC100) estribaban en el contenido de proteína bruta (mayor en los destríos que en la cebada) y carbohidratos solubles (mayor en la cebada que en los destríos) y éstas no eran muy marcadas.

Ciertos investigadores han observado que la incorporación de una mayor cantidad de grano o concentrado en la dieta no va siempre aparejada a una disminución en los niveles de microorganismos celulolíticos (Mackie *et al.*, 1978; Khafipour *et al.*, 2009; Palmonari *et al.*, 2010). Estos microorganismos, a pesar de ser muy sensibles al pH, pueden sobrevivir si el descenso en el mismo se produce de forma gradual o no es muy acusado. Además, estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que la exposición prolongada a pH bajos, pero siempre superiores a 6, no tiene un gran efecto sobre la actividad de los organismos celulolíticos (Hiltner y Dehority, 1983). Una excesiva acidificación limita el crecimiento de los hongos, aunque esto no ocurre cuando los valores de pH son próximos a los fisiológicos (Gordon y Phillips, 1989; Kamra *et al.*, 2003). Por otra parte, algunos autores han apuntado que las dietas que promueven cambios en el pH ruminal ejercen un impacto sobre las poblaciones de arqueas metanogénicas (Lana *et al.*, 1998). El efecto parece deberse a cambios en la composición relativa de diferentes especies o grupos de arqueas, más que a los que se producen en la densidad de arqueas totales (Wright *et al.*, 2004). Los valores medios de pH, registrados en el **experimento 2**, no eran muy diferentes para las dietas HC y LC y siempre se mantuvieron por encima de 6 (6,31- 6,53, respectivamente). En el **experimento 5**,

los valores de pH, aunque significativamente diferentes entre dietas, siempre se mantuvieron en valores superiores a 6 (6,28 para la dieta CO; 6,41 para la dieta TO100; 6,46 para la dieta CU100; 6,36 para la dieta TC100) por lo que parece lógico que no se encontrasen diferencias, en cuanto a la microbiota, entre tratamientos experimentales.

Tabla 5.1. Efecto de la dieta sobre las abundancias de bacterias totales, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, hongos, arqueas metanogénicas y protozoos y la diversidad y homogeneidad de las poblaciones bacterianas en fermentadores de flujo continuo simple.

	Dieta ¹				EEM ²	P-valor
	Control	T100	C100	TC100		
Copias génicas/g MF						
Bacterias (x 10 ⁹)	8,48	10,4	5,30	8,20	1,30	0,579
<i>Fibrobacter succinogenes</i> (x 10 ⁸)	6,73	6,92	4,46	6,30	0,853	0,703
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> (x 10 ⁶)	1,50 ^b	3,26 ^a	0,811 ^b	1,37 ^b	0,186	0,028
Hongos (x 10 ⁷)	8,90	8,04	6,33	6,24	1,02	0,720
Metanogénicos (x 10 ⁸)	1,48	1,64	0,961	1,24	0,174	0,542
Protozoos (x 10 ⁸)	6,48	4,63	2,10	2,47	0,577	0,125
Diversidad bacteriana						
Índice de Shannon	2,36	2,22	2,44	2,72	0,215	0,850
Homogeneidad de Shannon	0,892	0,863	0,932	0,842	0,018	0,304

¹Control: dieta con 25% grano de cebada, 5% avena trigo, 15% torta de girasol, 30% paja de cereal y 22% heno de alfalfa; T5: dieta basada en la control con 25% de tomate reemplazando a la cebada; C5: dieta basada en la control con 25% de pepino; TC5: dieta basada en la control con 25% de una mezcla tomate: pepino (1:1) reemplazando a la cebada.

²EEM = error estándar de la media.

Dentro de una misma línea, aquellos valores con diferente superíndice difieren significativamente entre sí (P > 1,05). El test *post-hoc* empleado para llevar a cabo las comparaciones pareadas fue el LSD.

Es interesante resaltar que, en el **experimento 2**, las abundancias bacterianas sí eran significativamente más altas para aquellos animales alimentados con la dieta HC que con la LC, aunque no lo fuesen para los FFCS. Diversos estudios, realizados *in vivo*, han encontrado mayores densidades bacterianas en animales alimentados con una elevada cantidad de concentrado en la dieta, indicando que el número de bacterias tiende a subir con la disponibilidad de energía (Dehority y Orpin, 1997). En nuestro caso, puesto que las dietas que se emplearon en el **experimento 2** eran isoenergéticas (**Tabla 4.2.1** de la **publicación 2**), parece más bien que la velocidad en la degradación de los sustratos, mayor en el concentrado que en la fibra, fuera la que determinase tales diferencias en las concentraciones bacterianas. Las diferencias encontradas entre los resultados *in vivo* e *in vitro* pueden deberse a las limitaciones en el potencial de simulación de los fermentadores con determinadas dietas (Carro *et al.*, 2009).

No se observaron cambios significativos en la diversidad y estructura de las poblaciones bacterianas desarrolladas *in vitro*, por efecto de la dieta, en los **experimentos 2** y **5**. En la actualidad, no existe suficiente información para establecer si la diversidad bacteriana aumenta o no al incrementar el porcentaje de fibra en la dieta, puesto que los trabajos realizados a este respecto *in vivo* muestran divergencias considerables (Kocherginskaya *et al.*, 2001; Larue *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2010b). La poca información existente acerca de la composición bacteriana en sistemas *in vitro* también muestra ciertas divergencias. Martínez *et al.* (2010b) observan, en un experimento realizado en Rusitec, un efecto del tipo de forraje sobre la estructura de las poblaciones bacterianas de los *pellets* BAS pero no así en los *pellet* BAL, cuya estructura bacteriana se afecta por la relación forraje: concentrado de la dieta.

Diferencias en la relación forraje:concentrado de la dieta no tienen un impacto sobre las abundancias de bacterias totales, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, hongos y arqueas metanogénicas ni sobre la diversidad y estructura de la comunidad bacteriana, probablemente debido a que estas dietas no promueven diferencias importantes del pH en el sistema *in vitro*. La incorporación de tomate y pepino a una dieta, como sustitutos de la cebada, no ejerce ningún efecto sobre las abundancias de los

misimos grupos microbianos considerados ni sobre la diversidad de las poblaciones bacterianas.

5.4. POTENCIAL DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES PARA SUSTITUIR A LA CEBADA EN DIETAS PARA RUMIANTES

Las variaciones pluviométricas, intra e interanuales, en las regiones de clima mediterráneo hacen que el periodo vegetativo de los recursos para mantener animales en pastoreo sea muy corto, por lo que su disponibilidad es escasa y estacional. Aunque los pequeños rumiantes se alimentan también con otros recursos como barbechos y rastrojeras, procedentes de los cultivos, los requerimientos energéticos de los mismos hacen necesario frecuentemente el empleo de concentrados. Los residuos y subproductos agroindustriales representan importantes recursos alternativos para la alimentación de pequeños rumiantes (Boza *et al.*, 1985; Vasta *et al.*, 2008). Un residuo agrícola es aquella fracción o fracciones de un cultivo que no constituye la cosecha propiamente dicha o, aquella parte de la cosecha que no cumple los requisitos de calidad mínima para ser comercializada como tal (Infoagro.com). La agricultura intensiva genera volúmenes importantes de destríos cuya utilización, por el ganado caprino, podría permitir periodos de descanso a la cobertura herbácea así como completar las dietas de los animales en épocas de escasez de pastos naturales, reduciendo los costes económicos (Boza *et al.*, 1985).

En España, el tomate y el pepino se encuentran entre las más abundantes de las hortalizas. Gran parte de su producción proviene del cultivo en invernaderos, que genera una abundante cantidad de desechos durante todo el año. Nuestra hipótesis fue que el caprino, debido a su importante capacidad de digerir alimentos de baja calidad, podría utilizar estos recursos de forma muy efectiva. Sin embargo, los residuos de cosecha pueden presentar un mal estado fitosanitario como resultado de la incidencia de plagas y enfermedades en el cultivo así como contenidos variables de materias activas utilizadas en los tratamientos fitosanitarios del cultivo (Infoagro.com), por lo que su empleo en animales requiere su previa validación en ensayos *in vitro*. Los **experimentos 4 y 5** se llevaron a cabo para

evaluar el impacto de la sustitución parcial o total de la cebada en la dieta por tomate y pepino, procedentes del cultivo en invernaderos, sobre la fermentación ruminal y la microbiota.

Uno de los inconvenientes de la utilización de subproductos en la alimentación del ganado es la variabilidad en su contenido hídrico, que depende del desarrollo ontogénico del cultivo en la época de recolección, composición química, bajos contenidos en proteína y elevado en lignocelulosa (Vasta *et al.* 2008). Los análisis repetidos de la composición química de tomate y pepino, a lo largo de 6 meses (**Tabla 5.1** de la discusión), mostraron solo ligeras variaciones. La producción bajo condiciones de cultivo muy controladas da lugar a una alta homogeneidad entre cosechas. Esta relativa estabilidad en composición química, con respecto a otros subproductos como alpeorujos, vinazas, etc., indica un gran potencial de estos residuos para su utilización en alimentación animal.

Tabla 5.1. Composición química de destríos de tomate y pepino en diferentes momentos del año 2007.

	Julio		Octubre		Noviembre		Diciembre	
	Tomate	Pepino	Tomate	Pepino	Tomate	Pepino	Tomate	Pepino
MS, g/100 g MF	6,86	3,37	7,48	3,41	6,45	3,70	6,89	4,02
g/100 g MF								
MO	89,3	89,4	89,9	88,7	87,6	88,7	84,6	90,0
PB	15,5	17,1	15,3	16,3	14,3	17,4	15,6	17,5
EE	4,47	1,33	3,88	1,30	3,50	0,85	3,18	0,78
FND	20,7	16,2	19,1	16,8	17,8	13,9	20,9	14,3
FAD	14,6	12,6	13,9	13,1	13,0	11,1	14,9	11,9
LAD	5,24	0,23	4,87	0,25	3,69	0,76	4,07	0,67

En el **experimento 4**, llevado a cabo con CRNRM, se observó que las producciones de gas y de AGVs, así como la tasa de producción de gas o las proporciones molares de la mayoría de los AGVs individuales no se afectaban por el tipo de dieta ensayada. Puesto que la mayor parte de los parámetros fermentativos no resultaron afectados por el tipo de fruto empleado (tomate, pepino o su mezcla), ni por el nivel en que se incorporaron a la dieta (5, 10, 15, 20, 25% del total de ingredientes), se decidió que solo aquellas dietas con más cantidad de subproducto (25%) serían estudiadas en los FFCS. Por la misma razón, se decidió no estudiar el efecto del tipo de residuo o del nivel de incorporación en la dieta sobre las poblaciones microbianas.

En el **experimento 5**, llevado a cabo con FFCS, se observaron diferencias entre dietas tanto en el pH como en las proporciones molares de distintos AGVs, mientras que la producción total de los mismos no se vio afectada. Las proporciones molares de *iso*-butírico e *iso*-valérico eran inferiores para las dietas experimentales que para la dieta control, pero estos datos no estaban correlacionados con los valores de flujo o degradación de nitrógeno. Por otra parte, las dietas que incluían pepino, reemplazando total o parcialmente a la cebada, promovían una fermentación con menor proporción de acético y mayor de propiónico que la dieta control o la dieta con tomate, lo que podía deberse a una mayor disponibilidad de carbohidratos de fermentación rápida en los destríos de pepino que en el tomate o en la cebada (Ørskov y Ryle, 1990). Los parámetros estudiados, en relación al metabolismo del nitrógeno, no difirieron para ninguna de las dietas experimentales. Exceptuando a las poblaciones de *Ruminococcus flavefaciones*, ni las densidades del resto de grupos microbianos ni la diversidad bacteriana se afectaron por el tipo de destrío incluido en la dieta.

Los datos obtenidos, en cuanto a la producción de gas y de AGVs así como al metabolismo del nitrógeno y las poblaciones microbianas presentes en CNRMR y en FFCS muestran que la incorporación en la dieta de hasta un 25% de destríos de invernadero (tomate y pepino) no ejercería ningún efecto negativo sobre la fermentación y las poblaciones microbianas.

Consideraciones logísticas y económicas sobre el empleo de tomate y pepino en dietas para pequeños rumiantes

El precio de la cebada grano se situaba, en Febrero del 2011, en 231 euros/tonelada, por lo que en una dieta con un 25% menos de cebada, el productor podría ahorrarse hasta 58 euros por cada tonelada de pienso producido. No obstante, esta estimación no tiene en cuenta otros gastos derivados del transporte de los subproductos a la explotación ganadera o del procesado de los destríos para incorporarlos a la dieta de los rumiantes. La cantidad de materia fresca en 1 kg de pienso sería bastante alta puesto que tomate y pepino tienen porcentajes de materia seca bajos (6,8 y 3,6 %, respectivamente). Para producir 1 kg de las dietas TO, CU ó TC se necesitarían (en peso fresco) 3,7 kg de tomate, 6,9 kg de pepino ó 4,8 kg de una mezcla 1:1 de tomate: pepino, respectivamente. De cara a su rentabilidad económica debería tenerse en cuenta, por tanto, el coste del transporte de estos subproductos desde los invernaderos de origen así como de su procesado (mano de obra y maquinaria necesaria) para realizar un estimación más aproximada del beneficio obtenido por el ganadero, con respecto al empleo de la cebada.

Debido al bajo porcentaje de materia seca de estos destríos debería evaluarse el modo de su incorporación a la dieta. Otros subproductos con una alta humedad se han incorporado exitosamente en dietas para rumiantes, mediante su ensilado o la preparación de bloques multi-nutrientes (Ben Salem y Smith, 2008; Molina-Alcaide *et al.*, 2010). Ciertos estudios realizados en vacuno y ovino con pulpa de tomate ensilada no han mostrado efectos negativos de su empleo sobre la producción de leche y la composición de la misma en vacuno y ovino (Weiss *et al.*, 1997; Di Francia *et al.*, 2004). En nuestro grupo también se ha estudiado el efecto de la inclusión de los destríos de tomate y pepino en bloques multi-nutrientes en la dieta de cabras en lactación, aunque en este momento no se dispone aún de los resultados.

Posibles ventajas del empleo de destríos de invernadero para el productor ganadero

La reforma del 2003 de la Política Agraria Común (PAC) en la UE ha impuesto una serie de cambios en las ayudas que reciben los productores. Actualmente, los dos grandes ejes de la PAC consisten en apoyar la competitividad de los productores europeos y en fomentar el desarrollo de las zonas rurales, especialmente de las menos favorecidas. Las modalidades de financiación de los agricultores se centran cada vez más en el respeto al medio ambiente, el bienestar animal y en la calidad de los productos, más que en su volumen (*web* de la Comisión Europea). Ciertos autores han señalado que tal reforma podría suponer, a la larga, la desaparición de ciertas explotaciones de caprino, en especial aquellas con un carácter más tradicional (Castel *et al.*, 2010). La incorporación de dietas con destríos de invernadero, al eliminar parte de estos residuos del medio ambiente, podría suponer, para el productor, la captación de fondos europeos.

Capítulo 6

Conclusiones

1.- La estructura de la comunidad bacteriana ruminal es altamente dependiente del animal hospedador que la alberga. Además, esta comunidad bacteriana presenta una elevada resistencia a la colonización por microorganismos procedentes de otros individuos, incluso de la misma especie y raza.

2.- La manipulación del contenido ruminal, para su inoculación en un sistema de incubación *in vitro*, supone una pérdida importante de biomasa microbiana, sobre todo de aquellos microorganismos ligados a las partículas del contenido del rumen.

3.- En cultivos no renovados de microorganismos ruminales, la densidad de microorganismos a las 24 horas de incubación, incluidos los fibrolíticos, es adecuada para estudiar el efecto de una amplia variedad de dietas sobre la producción del gas de fermentación y de ácidos grasos volátiles. Sin embargo, tras 48-72 horas de incubación, la abundancia de microorganismos es inferior a la de la fracción líquida del contenido del rumen.

4.- En fermentadores de flujo continuo simple, el consorcio microbiano del contenido de los vasos de fermentación es muy similar, tanto en densidad como en diversidad, al de la fracción líquida de la digesta ruminal. El consorcio microbiano de los vasos de fermentación es también similar al de los efluentes, excepto por sus menores abundancias de algunas bacterias celulolíticas y de hongos. Esto refuerza la validez de los efluentes para analizar determinados parámetros de la fermentación ruminal *in vitro*.

5.- Aunque no se puede afirmar, de manera general, la posibilidad de reducir el periodo de adaptación a la dieta a menos de los 7 días normalmente empleados en fermentadores de flujo continuo simple, sí sería posible cuando las dietas que se estudian en fermentadores son iguales o similares a las suministradas a los animales donantes del inóculo.

6.- La relación forraje: concentrado en dietas basadas en heno de alfalfa no parece tener un efecto sobre las poblaciones microbianas que se desarrollan en fermentadores de flujo continuo simple.

7.- La incorporación en la dieta de hasta un 25% de destríos de tomate o pepino, como sustitutivos de la cebada, no parece comprometer la fermentación, ni las abundancias microbianas, ni la diversidad bacteriana, tanto en cultivos no renovados de microorganismos ruminales como en cultivos continuos o fermentadores.

Conclusions

1.- Rumen bacterial community structure is highly dependent on the host animal. This bacterial community is very resilient to be colonized by rumen microorganisms from other animals, even of the same species and breed.

2.- The processing of the rumen content for inoculating an *in vitro* system involves an important loss of microbial biomass, especially that of microorganisms associated to feed particles.

3.- In batch cultures, the microbial density after 24 h of incubation, including fibrolytic microorganisms, is suitable to study the effect of a wide range of diets on the production of gas and volatile fatty acids. However, after 24-48 h of incubation, microbial abundances are lower in batch cultures than in the liquid fraction of rumen content.

4.- The microbial consortium which resides in single-flow continuous-culture fermenters is very similar, both in density and diversity, to that associated to the liquid fraction of the rumen content. Microbial consortium in fermenters is, also, similar to that found in effluents, with the exception of lower abundances of some cellulolytic bacteria and fungi in effluents. This supports the suitability of using effluents to analyze some *in vitro* fermentation parameters.

5.- In single-flow continuous-culture fermenters, it cannot be generally stated the possibility of reducing the adaptation period to diet below 7 days (time normally used). However, it would be possible to reduce the adaptation period when diets incubated in fermenters were equal or similar to those provided to donor animals.

6.- The forage to concentrate ratio in alfalfa hay-based diets does not seem to affect microbial populations in single-flow continuous-culture fermenters.

7.- The incorporation in diets for ruminants of up to 25 % of tomato and cucumber wastes, as barley substitutes, does not seem to compromise microbial fermentation and abundances and bacterial diversity either in batch cultures or in continuous cultures.

Capítulo 7

Resumen

En este trabajo se estudian diversos aspectos de interés en nutrición de rumiantes: i) la variabilidad en la microbiota ruminal entre animales; ii) la capacidad de simulación de la microbiota ruminal en diferentes sistemas *in vitro*; iii) el potencial de destríos de invernadero como alimentos alternativos a la cebada en dietas para caprino.

El primer aspecto se abordó mediante el **experimento 1**, el cual se llevó a cabo para determinar la variabilidad de las poblaciones bacterianas entre distintos animales de la misma especie y raza así como la persistencia de esta variabilidad tras introducir contenido ruminal de otro animal. El ensayo se realizó con cabras de un mismo rebaño. Mediante T-RFLP se estudiaron las diferencias en la estructura de las poblaciones bacterianas de los distintos animales antes y después de llevar a cabo un intercambio de parte del contenido ruminal entre ellos. Los resultados del análisis cluster mostraron que, en términos de estructura bacteriana, las muestras de contenido ruminal del mismo animal siempre se agrupaban entre sí, independientemente del día y momento del muestreo. Esto es indicio de que existen marcadas diferencias en la composición bacteriana ruminal entre animales. Además, puesto que estas diferencias persisten tras la introducción de microorganismos de otro animal, se puede concluir que las poblaciones bacterianas indígenas de un animal son muy resistentes a ser desplazadas por las de otros individuos.

El segundo aspecto de este trabajo se abordó en los experimentos 2, 3, 4 y 5. Los experimentos 3, 4 y 5 también se realizaron para abordar el tercer aspecto mencionado anteriormente.

El **experimento 2** se llevó a cabo para estudiar los cambios provocados en las abundancias de varios grupos microbianos (bacterias totales, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, hongos y arqueas metanogénicas), por un lado, y en la diversidad y estructura bacterianas, por otro lado, como consecuencia de la preparación del inóculo ruminal y la adaptación a la dieta en fermentadores de flujo continuo simple (FFCS). Las dietas empleadas en este experimento estaban basadas en heno de alfalfa y concentrado en 2 proporciones (70:30, dieta LC, y 30:70, dieta HC). La duración de las incubaciones en los fermentadores fue de 7 días. Los resultados de este experimento mostraron que las densidades de todos

los grupos microbianos considerados eran inferiores en el contenido de los fermentadores que en el contenido del rumen. Aunque no se observaron diferencias en la diversidad bacteriana entre rumen y fermentadores, sí se detectaron divergencias en la composición bacteriana de ambos ecosistemas. Estos resultados indican que, puesto que la extracción y procesamiento del contenido ruminal previos a su inoculación en los fermentadores supone una pérdida importante de biomasa microbiana, habría de reconsiderarse el protocolo de preparación del inóculo ruminal para incluir cierta cantidad de sólidos o modificar el momento de la toma del contenido ruminal. Por otro lado, a lo largo de la incubación en fermentadores, no se observaron cambios en las abundancias microbianas, diversidad o estructuras bacterianas lo que indica que el tiempo de adaptación del sistema podría ser inferior al establecido como óptimo (7 días) para estudios en FFCS, que utilizan dietas similares a las que toman los animales. La relación forraje:concentrado en dietas basadas en heno de alfalfa no tuvo ningún efecto sobre las abundancias microbianas, diversidad o estructura bacterianas en los FFCS.

El **experimento 3** consistió en una incubación, en el sistema digestor Daisy^{II} de ANKOM, de los ingredientes de las dietas utilizadas en los experimentos 4 y 5 (cebada, paja de trigo, harina de salvado de trigo, torta de girasol, heno de alfalfa, tomate y pepino) para determinar sus digestibilidades, siguiendo el procedimiento descrito por Tilley y Terry (1963). Las muestras se incubaban durante 48 horas en una mezcla de contenido ruminal filtrado y saliva artificial de McDougall (1948). El **experimento 4** consistió en 3 incubaciones, de 72 horas de duración cada una, en un sistema de cultivos no renovados de microorganismos ruminales, de una dieta control y 15 dietas experimentales en las que la cebada se reemplazaba por cantidades crecientes de destríos de tomate, pepino o una mezcla (1:1) de ambos tipos de destríos. El inóculo empleado consistía en una mezcla de contenido ruminal filtrado y una disolución mineral y tamponadora (Goering y van Soest, 1970). Se midieron la presión y el volumen de gas producido en los frascos a intervalos regulares y se analizaron diversos parámetros de la fermentación (pH, AGVs, amonio) y la composición de los residuos, tras 24 horas de incubación. Los resultados de la fermentación microbiana y la producción de gas en el

experimento 4 mostraron que ni el tipo de destrío ni su cantidad en la dieta afectaban al pH, la producción de gas o los parámetros de la cinética de producción del mismo (velocidad y producción potencial máxima), la concentración de amonio, la producción de AGVs o las proporciones molares de la mayoría de los AGVs. La ausencia de diferencias significativas, derivadas de la cantidad de cebada que se sustituía por los destríos, hizo que en el **experimento 5** se optase por evaluar comparativamente la dieta control y aquellas que incluían los niveles más elevados de destríos de tomate, de pepino y de la mezcla tomate-pepino. Se llevaron a cabo 2 series de incubación utilizando FFCS, en los que se inoculaba líquido ruminal filtrado. Cada serie de incubación incluía un periodo de adaptación a las dietas de 4 días de duración y 3 días de recogida de alícuotas de los efluentes para determinar AGVs, amonio y nitrógeno total, así como la composición química de los efluentes y de los *pellets* bacterianos de los efluentes. En este experimento se observó que las dietas con tomate o pepino promovían valores de pH superiores a los alcanzados con la fermentación de las dietas control o de la que contenía ambos subproductos. La producción total de AGVs no se afectó por el tipo de dieta aunque sí lo hicieron las proporciones molares de la mayor parte de los AGVs determinados. Las proporciones molares de acético eran inferiores con aquellas dietas que incluían pepino o la mezcla tomate:pepino. La proporción de propiónico y la relación acético:propiónico eran menores y mayores, respectivamente, con las dietas que incluían tomate en comparación con el resto de las dietas estudiadas. Las proporciones molares de ácidos grasos ramificados fueron significativamente inferiores con las dietas que incluían destríos de invernadero, en comparación con la dieta control. La digestibilidad de la materia orgánica y de los carbohidratos, así como la eficiencia de producción de AGVs, o los parámetros relativos al metabolismo del N no se afectaban por la inclusión de los destríos en la dieta.

Este trabajo representa la primera información comparada de la capacidad de diferentes sistemas *in vitro* para sustentar una microbiota que permita una simulación adecuada de la fermentación ruminal. En los **experimentos 3, 4 y 5** se tomaron muestras del inóculo inicial y en diferentes momentos de la incubación, para analizar las abundancias de varias poblaciones microbianas (bacterias, hongos, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, hongos, arqueas metanogénicas y

protozoos), mediante RT-qPCR, así como la diversidad y estructura bacteriana, mediante T-RFLP. En el sistema de incubación Daisy^{II} de ANKOM (**experimento 3**) se observó que las poblaciones de los organismos fibrolíticos (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* y hongos) experimentaban un considerable descenso, tras 48 horas de incubación. Sin embargo, la densidad de las bacterias y los protozoos disminuyó en menor medida o no lo hizo, respectivamente, mientras que la de las arqueas metanogénicas aumentó en ese mismo periodo de tiempo. En cultivos no renovados de microorganismos ruminales (CNRMR, **experimento 4**), las poblaciones de bacterias, protozoos y metanogénicos no cambiaron a lo largo de 24 horas de incubación, mientras que los microorganismos fibrolíticos aumentaron. Tras 72 horas de incubación, la abundancia de todos los microorganismos analizados disminuyó significativamente. La diversidad bacteriana y el número de especies se redujeron considerablemente, tanto en el sistema Daisy^{II} como en los CNRMR, al final de la incubación. En FFCS (**experimento 5**), tras 4 días de incubación, la densidad de las bacterias totales no cambió pero disminuyó la de los protozoos y arqueas metanogénicas, con respecto a las encontradas en el inóculo original. Los organismos fibrolíticos aumentaron en ese periodo de tiempo. La composición en especies y la diversidad bacterianas eran muy similares en el inóculo ruminal, antes de iniciarse la incubación, y en los contenidos de los fermentares, tras 4 días de incubación. La abundancia de microorganismos fibrolíticos era menor en los efluentes, el 5^o día de incubación, que en el contenido de los fermentadores pero no se observaron diferencias en la abundancia del resto de grupos microbianos así como en la diversidad y composición bacterianas. Estos resultados indicaron que: a) a pesar de la pérdida de numerosas especies bacterianas detectada en los CNRMR, estos sistemas *in vitro* pueden mantener la biomasa de los principales grupos microbianos, a las 24 horas de incubación, en niveles muy similares a los encontrados en el inóculo ruminal de partida; b) en FFCS, las abundancias bacterianas y de microorganismos fibrolíticos, así como la diversidad bacteriana encontradas muestran que este sistema de simulación *in vitro* mantiene un ecosistema muy similar al que existe en la fracción líquida del contenido ruminal; c) las abundancias de bacterias, protozoos y metanogénicos, así como la diversidad bacteriana encontradas en efluentes

refuerzan su idoneidad para el estudio cualitativo y cuantitativo de determinados productos de la fermentación ruminal en estudios con FFCS.

El bajo o nulo impacto de los destríos de invernadero (tomate y pepino), incorporados hasta en un 25% de la ración, sobre la fermentación, el metabolismo del nitrógeno, la biomasa microbiana y la diversidad bacteriana muestran el potencial de estos subproductos para ser empleados como sustitutos de la cebada en dietas para rumiantes.

Summary

In this work, different issues of interest in ruminant nutrition are studied: i) the variability in the rumen microbiota among animals; ii) the simulation of the rumen ecosystem in different *in vitro* systems; iii) the potential of wastes from greenhouse horticulture as alternative feeds to barley in ruminant feeding.

Experiment 1 was carried out to determine the variability of bacterial populations among animals belonging to the same species and breed and the persistence of the variability after introducing in one animal, part of the rumen content from other animal. Three Granadina goats from the same flock were used. Differences in bacterial populations' structure among animals before and after swapping a part of rumen content were analyzed by using T-RFLP. Cluster analysis showed that, in terms of bacterial structure, ruminal samples from the same animal always grouped together, independently of the sampling day and time. This indicated marked differences in bacterial composition among animals from the same species. Differences remained after swapping of ruminal contents indicating that indigenous bacterial populations are very resilient to be displaced by those from other animals.

Experiment 2 was carried out to study changes in the abundances of different microbial groups (bacteria, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, fungi and methanogenic archaea) and in the bacterial diversity and structure due to the processing of rumen content and adaptation to diet in single-flow continuous-culture fermenters (SFCCF). Alfalfa hay and concentrate in 2 different ratios (70:30 for diet LC, and 30:70 for diet HC) were incubated during 7 days. Densities of all the considered microbial groups were lower in fermenter contents than in rumen content. There were not differences regarding bacterial diversity between rumen and fermenters, but bacterial composition was different. Extraction and processing of rumen content prior to its inoculation in fermenters involved an important loss of microorganisms indicating the need of reconsidering protocol for ruminal inoculum preparation. There were not changes in microbial abundances, bacterial diversity or structure throughout the incubation in fermenters, which indicated that adaptation period in fermenters could be lower than the previously established as optimum (7 days) in studies with equal or

similar diets to those used to feed donors. The forage to concentrate ratio in diet based on alfalfa hay did not have any impact on microbial abundances, bacterial diversity or structure in SFCCF.

In **experiment 3**, barley, cereal straw, wheat bran, sunflower meal, alfalfa hay, tomato and cucumber were incubated in an ANKOM Daisy^{II} digester to determine their nutrients digestibility following the procedure described by Tilley and Terry (1963). Samples were incubated for 48 h in a medium composed of rumen liquor and artificial saliva (McDougall, 1948).

In **experiment 4**, a control diet including barley and 15 experimental diets in which barley was replaced by growing quantities of tomato, cucumber or a mix (1:1) of both wastes were incubated for 72h in batch cultures. Inoculum was a mix of rumen liquor and a buffer solution (Goering and van Soest, 1970). Pressure and volume of gas produced were measured at regular intervals and some fermentation parameters (pH, VFAs, ammonia) and chemical composition of residues after 24 hours of incubation were analyzed. Either the type of waste or its level in diet did not affect pH, gas production or kinetic parameters (rate and potential maximum production of gas), ammonia concentration, total VFA production or molar proportions of most individual VFA.

In **experiment 5**, diets which included the highest levels of tomato, cucumber and the tomato:cucumber mix were chosen among those used in experiment 4 for incubation in single-flow continuous-culture fermenters(SFCCF). Two incubation runs were carried out, each one including a 4 d-adaption period to diet and a 3 d-collection period in which aliquots from effluents were taken to analyze VFA and ammonia concentration, effluent chemical composition and bacterial pellets chemical composition. Diets including tomato or cucumber produced higher pH in fermenters than the rest of diets. VFA total production was not affected by the type of diet but individual molar proportions of VFA did show some differences according to the experimental diet. Acetate molar proportion was lower with diets including cucumber or the tomato:cucumber mix than control or tomato-based diets. Acetate:propionate ratios were higher for diets including tomato in comparison to the other diets. Branched chain fatty acids were lower for diets including wastes than in the control one. Organic matter and carbohydrate

digestibilities, VFA production efficiency and N metabolism parameters were not affected by the inclusion of wastes in diet.

This work is the first one that compares the capacity of different *in vitro* systems to hold a microbiota that allows for a suitable simulation of ruminal fermentation. In **experiments 3, 4 and 5**, samples from original inoculum and after different incubation times were taken to analyze microbial abundances (total bacteria, fungi, archaea and protozoa and *Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus flavefaciens* populations) by RT-qPCR, and bacterial diversity and structure by T-RFLP. In a Daisy^{II} digester (**experiment 3**), fibrolytic microorganisms (*Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus flavefaciens* and fungi) declined considerably after 48 h of incubation while bacterial and protozoal densities did not decline so marked or did not decline at all, respectively. Methanogenic archaea rose in the same time interval. In batch cultures (**experiment 4**), bacterial, protozoal and archaeal populations did not change and fibrolytics increased after 24 h of incubation. After 72 h of incubation all the microbial abundances were lower both in the Daisy^{II} digester and in batch cultures. Bacterial diversity and species number were much lower in the Daisy^{II} digester and in batch cultures at the end of the incubation. After 4 d of incubation in SFCCF (**experiment 5**), bacteria density did not change in relation to that found in the original inoculum. However, there were changes in the abundances of the rest of microorganisms in the same time interval: protozoa and archaea declined and fibrolytics increased. Bacterial diversity and species composition were very similar in the inoculum and in fermenter contents after 4 d of incubation. While fibrolytics were lower in effluents at 5th d of incubation, the rest of microbial groups abundances and bacteria diversity and species composition were very similar, the same day, to those found in fermenters. These results indicate that: a) regardless of the loss of many bacterial species in batch cultures, this *in vitro* system can hold similar microbial densities after 24 h of incubation to those found in the rumen liquor used as inoculum; b) the abundances of bacteria and fibrolytic microorganisms and the bacterial diversity in SFCCF showed that this *in vitro* system holds a very similar ecosystem to that in the liquid fraction of rumen content; c) bacteria, protozoa and archaea abundances in

effluents support their suitability for the qualitative and quantitative study of some fermentation products in SFCCF experiments.

The use of wastes (tomato and cucumber) from greenhouse horticulture incorporation in diets for ruminants did not have any impact in most of the fermentation parameters in batch cultures and SFCCF, with the exception of molar proportions of VFA. Nitrogen metabolism, microbial abundances and bacterial diversity in SFCCF were not affected either by tomato or cucumber presence in diets. These results showed the potential of these wastes to be used as substitute of barley in diets for ruminants.

Capítulo 8

Bibliografía²

² Referencias de todo el texto, exceptuando las que aparecen exclusivamente en el capítulo de resultados.

- AOAC INTERNATIONAL (2005). *Official Methods of Analysis 18th ed.* Gaithersburg, MD, EEUU: Assoc. Off. Anal. Chem.
- Abe, M. & Iriki, T. (1978). Effects of diet on the protozoa population in permeable continuous cultures of rumen contents. *British Journal of Nutrition*. 39(2): 255-264.
- Abe, M., Iriki, T., Tobe, N. & Shibui, H. (1981). Sequestration of holotrich protozoa in the reticulo-rumen of cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. 41(3): 758-765.
- Adesogan, A. T. (2002). What are feeds worth? A critical evaluation of selected nutritive value methods. In: *Proceedings 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*, 33-47. Gainesville, FL, EEUU: University of Florida.
- Adler, J. H., Dye, J. A., Boggs, D. E. & Williams, H. H. (1958). Growth of rumen microorganisms in an *in vitro* continuous-flow system on a protein-free diet. *The Cornell Veterinarian*. 48(1): 53-66.
- Akin, D. E. & Borneman, W. S. (1990). Role of rumen fungi in fiber degradation. *Journal of Dairy Science*. 73(10): 3023-3032.
- Akin, D. E. & Rigsby, L. L. (1987). Mixed fungal populations and lignocellulosic tissue degradation in the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(9): 1987-1995.
- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 59(1): 143-169.
- Ammar, H., López, S., Bochi-Brum, O., García, R. & Ranilla, M. J. (1999). Composition and *in vitro* digestibility of leaves and stems of grasses and legumes harvested from permanent mountain meadows at different stages of maturity. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 8: 599-610.
- Ammar, H., López, S., González, J. S. & Ranilla, M. J. (2004). Chemical composition and *in vitro* digestibility of some Spanish browse plant species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84(2): 197-204.
- Armstrong, R. H., Common, T. G. & Davies, G. J. (1989). The prediction of the *in vivo* digestibility of the diet of sheep and cattle grazing indigenous hill plant communities by *in vitro* digestion, faecal nitrogen concentration or indigestible' acid-detergent fibre. *Grass and Forage Science*. 44(3): 303-313.
- Artis, D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Reviews Immunology*. 8(6): 411-420.
- Avaniss-Aghajani, E., Jones, K., Holtzman, A., Aronson, T., Glover, N., Boian, M., Froman, S. & Brunk, C. F. (1996). Molecular technique for rapid identification of *Mycobacteria*. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(1): 98-102.
- Ayres, J. F. (1991). Sources of error with *in vitro* digestibility assay of pasture feeds. *Grass and Forage Science*. 46(1): 89-97.
- Bach, A., Ruiz-Moreno, M., Thrune, M. & Stern, M. D. (2008). Evaluation of the fermentation dynamics of soluble crude protein from three protein sources in continuous culture fermenters. *Journal of Animal Science*. 86(6): 1364-1371.
- 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(1): 153-160.

- Belenguer, A., Toral, P. G., Frutos, P. & Hervás, G. (2010). Changes in the rumen bacterial community in response to sunflower oil and fish oil supplements in the diet of dairy sheep. *Journal of Dairy Science*. 93(7): 3275-3286.
- Belewu, M. A. & Ademilola, A. A. (2002). Digestibility response of WAD goat to mushroom (*Volvariella volvacea*) treated cotton waste. *Moor Journal of Agricultural Research*. 3: 83-86.
- Ben Salem, H., Ben Salem, I., Nefzaoui, A. & Ben Saïd, M. S. (2003). Effect of PEG and olive cake feed blocks supply on feed intake, digestion, and health of goats given kermes oak (*Quercus coccifera* L.) foliage. *Animal Feed Science and Technology*. 110(1-4): 45-59.
- Ben Salem, H. & Nefzaoui, A. (2003). Feed blocks as alternative supplements for sheep and goats. *Small Ruminant Research*. 49(3): 275-288.
- Ben Salem, H. & Smith, T. (2008). Feeding strategies to increase small ruminant production in dry environments. *Small Ruminant Research*. 77(2-3): 174-194.
- Bernalier, A., Fonty, G., Bonnemoy, F. & Gouet, P. (1992). Degradation and fermentation of cellulose by the rumen anaerobic fungi in axenic cultures or in association with cellulolytic bacteria. *Current Microbiology*. 25(3): 143-148.
- Beuvink, J. M. W. & Spoelstra, S. F. (1992). Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 37(4): 505-509.
- Beuvink, J. M. W., Spoelstra, S. F. & Hogendorp, R. J. (1992). An automated method for measuring time-course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid. *Netherlands Journal of Agricultural Science*. 40: 401-407.
- Blackwood, C. B., Hudleston, D., Zak, D. R. & Buyer, J. S. (2007). Interpreting ecological diversity indices applied to terminal restriction fragment length polymorphism data: insights from simulated microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(16): 5276-5283.
- Blackwood, C. B., Marsh, T., Kim, S. H. & Paul, E. A. (2003). Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(2): 926-932.
- Blanchart, G., Durand, M., Barry, J. L., Bouiller-Odot, M. & Jouany, J. P. (1989). Intérêts et limites des fermenteurs à flux semi-continu de type Rusitec dans l'étude des fermentations du rumen. *Annales de Zootechnie*. 38: 285-314.
- Blümmel, M., Makkar, H. P. S. & Becker, K. (1997). *In vitro* gas production: a technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 77(1-5): 24-34.
- Blümmel, M. & Ørskov, E. R. (1993). Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 40: 109-119.
- Boadi, D., Benchaar, C., Chiquette, J. & Massé, D. (2004). Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: update review. *Canadian Journal of Animal Science*. 84(3): 319-335.
- Bowie, W. C. (1962). *In vitro* studies of rumen microorganisms using a continuous flow system. *American Journal of Veterinary Research*. 23: 858-867.

- Boxma, B., de Graaf, R. M., van der Staay, G. W. M., van Alen, T. A., Ricard, G., Gabaldon, T., van Hoek, A. H. A. M., Moon-van der Staay, S. Y., Koopman, W. J. H., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G. M., Friedrich, T., Veenhuis, M., Huynen, M. A. & Hackstein, J. H. P. (2005). An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature*. 434(7029): 74-79.
- Boyazoglu, J., Hatziminaoglou, I. & Morand-Fehr, P. (2005). The role of the goat in society: Past, present and perspectives for the future. *Small Ruminant Research*. 60(1-2): 13-23.
- Boza, J., Silva, J. H. & Azocar, P. (1985). Recursos alimenticios en zonas áridas. In: *Simposio Internacional de la Explotación Caprina en Zonas Áridas*, 191-197. Fuerteventura, España: Servicio de Publicaciones Cabildo de Fuerteventura.
- Bray, J. R. & Curtis, J. T. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*. 27(4): 325-349.
- Broderick, G. A. (1987). Determination of protein degradation rates using a rumen *in vitro* system containing inhibitors of microbial nitrogen metabolism. *British Journal of Nutrition*. 58(03): 463-475.
- Broudiscou, L. P., Papon, Y. & Broudiscou, A. F. (2000). Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology*. 87(3-4): 263-277.
- Bruce, K. D. (1997). Analysis of *mer* gene subclasses within bacterial communities in soils and sediments resolved by fluorescent-PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism profiling. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(12): 4914-4919.
- Bryant, M. P. (1959). Bacterial species in the rumen. *Bacteriological Reviews*. 23: 125-153.
- Bryant, M. P. & Robinson, I. M. (1968). Effects of diet, time after feeding, and position sampled on numbers of viable bacteria in the bovine rumen. *Journal of Dairy Science*. 51(12): 1950-1955.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L. (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville, MD, EEUU: American Society of Plant Physiologists.
- Buchholz-Cleven, B. E. E., Rattunde, B. & Straub, K. L. (1997). Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe (II)-oxidizing bacteria using DGGE and whole-cell hybridization. *Systematic and Applied Microbiology*. 20(2): 301-309.
- Bueno, I. C. S., Abdalla, A. L., Cabral Filho, S. L. S., Vitti, D., Owen, E., Mauricio, R. M., Givens, I., Sutton, J. D. & Mould, F. L. (1999). Comparison of inocula from sheep and cattle for the *in vitro* gas production technique under tropical conditions. In: *Proceedings of the British Society of Animal Science*, 151.
- Bueno, M. S., Ferrari, E., Bianchini, D., Leinz, F. F. & Rodrigues, C. F. C. (2002). Effect of replacing corn with dehydrated citrus pulp in diets of growing kids. *Small Ruminant Research*. 46(2-3): 179-185.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Cardozo, P. W. & Kamel, C. (2005). Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*. 88(7): 2508-2516.
- Calsamiglia, S., Cardozo, P. W., Ferret, A. & Bach, A. (2008). Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *Journal of Animal Science*. 86: 702-711.

- 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(6): 1819-1827.
- Cantalapiedra-Hijar, G. (2009). Estudio de la utilización de nutrientes, de la fermentación y de las comunidades microbianas en el rumen de caprino y en fermentadores de flujo continuo simple. Tesis doctoral. Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal (Estación Experimental del Zaidín, CSIC) y Universidad de Granada.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D. R., Newbold, C. J. & Molina-Alcaide, E. (2011). The effect of the feed-to-buffer ratio on bacterial diversity and ruminal fermentation in single-flow continuous-culture fermenters. *Journal of Dairy Science*. 94(3): 1374-1384.
- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. (2004). Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science*. 82(11): 3230-3236.
- Carro, M. D., López, S., Valdés, C. & Ovejero, F. J. (1999). Effect of DL-malate on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen simulation technique (RUSITEC). *Animal Feed Science and Technology*. 79(4): 279-288.
- Carro, M. D. & Ranilla, M. J. (2003). Effect of the addition of malate on *in vitro* rumen fermentation of cereal grains. *British Journal of Nutrition*. 89(02): 181-188.
- Carro, M. D., Ranilla, M. J., Martín-García, A. I. & Molina-Alcaide, E. (2009). Comparison of microbial fermentation of high-and low-forage diets in sheep rumen, Rusitec and single-flow continuous-culture fermenters. *Animal*. 3-4: 527-534.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmstrom, C., Doolittle, W. F. & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 278-288.
- Castel, J. M., Ruiz, F. A., Mena, Y. & Sánchez-Rodríguez, M. (2010). Present situation and future perspectives for goat production systems in Spain. *Small Ruminant Research*. 89(2-3): 207-210.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S. & Ferret, A. (2006). Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. *Journal of Dairy Science*. 89(7): 2649-2658.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Losa, R. (2005). Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Animal Feed Science and Technology*. 119(1-2): 29-41.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Losa, R. (2007). Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 132(3-4): 186-201.
- Clarke, K. R. & Warwick, R. M. (1994). *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*. Plymouth, Reino Unido: Plymouth Marine Laboratory.
- Clement, B. G., Kehl, L. E., DeBord, K. L. & Kitts, C. L. (1998). Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods*. 31(3): 135-142.

- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T. & Garrity, G. M. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*. 37: D141-D145.
- Coleman, G. S. (1985). The cellulase content of 15 species of entodiniomorphid protozoa, mixed bacteria and plant debris isolated from the ovine rumen. *The Journal of Agricultural Science*. 104(02): 349-360.
- Coleman, G. S. (1986). The distribution of carboxymethylcellulase between fractions taken from the rumens of sheep containing no protozoa or one of five different protozoal populations. *The Journal of Agricultural Science*. 106(01): 121-127.
- Colombatto, D., Mould, F. L., Bhat, M. K. & Owen, E. (2007). Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the *in vitro* ruminal fermentation of alfalfa stems. *Animal Feed Science and Technology*. 137(1-2): 150-162.
- Collins, M. D. & Gibson, G. R. (1999). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 69(5): 1052S-1057S.
- Comisión Europea. Agricultura y Desarrollo Rural. Características de la agricultura europea. http://ec.europa.eu/agriculture/index_es.htm.
- Cone, J. W. (1998). The development, use and application of the gas production technique at the DLO Institute for Animal Science and Health (ID-DLO), Lelystad, The Netherlands. In: *In Vitro Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants*, BSAS Occasional Publication N° 22, 65-78 (Eds E. R. Deaville, E. Owen, A. T. Adesogan, C. Rymer, J. A. Huntington and T. L. J. Lawrence). Edinburgo, Reino Unido: BSAS.
- Cone, J. W., van Gelder, A. H. & Bachmann, H. (2002). Influence of inoculum source on gas production profiles. *Animal Feed Science and Technology*. 99(1-4): 221-231.
- Cone, J. W., van Gelder, A. H., Visscher, G. J. W. & Oudshoorn, L. (1996). Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Animal Feed Science and Technology*. 61(1-4): 113-128.
- Cotta, M. A. & Russell, J. B. (1982). Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture. *Journal of Dairy Science*. 65(2): 226-234.
- Counotte, G. H. M., van't Klooster, A. T., van der Kuilen, J. & Prins, R. A. (1979). An analysis of the buffer system in the rumen of dairy cattle. *Journal of Animal Science*. 49(6): 1536-1544.
- Craig, W. M., Broderick, G. A. & Ricker, D. B. (1987). Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. *The Journal of Nutrition*. 117(1): 56-62.
- Craig, W. M., Hong, B. J., Broderick, G. A. & Bula, R. J. (1984). *In vitro* inoculum enriched with particle-associated microorganisms for determining rates of fiber digestion and protein degradation. *Journal of Dairy Science* 67(12): 2902-2909.
- Crawford, R. J., Jr., Shriver, B. J., Varga, G. A. & Hoover, W. H. (1983). Buffer requirements for maintenance of pH during fermentation of individual feeds in continuous cultures. *Journal of Dairy Science*. 66(9): 1881-1890.

- Culman, S. W., Gauch, H. G., Blackwood, C. B. & Thies, J. E. (2008). Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study. *Journal of Microbiological Methods*. 75(1): 55-63.
- Curtis, T. P., Sloan, W. T. & Scannell, J. W. (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99(16): 10494-10499.
- Czerkawski, J. W. (1986a). Compartmentation in the rumen. In: *An Introduction to Rumen Studies*(Ed J. W. Czerkawski). Oxford, Reino Unido: Pergamon Press.
- Czerkawski, J. W. (1986b). Degradation of solid feeds in the rumen: spatial distribution of microbial activity and its consequences. In: *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*, 158-172 (Eds L. P. Miligan, N. L. Grovum and A. Dobson). Nueva Jersey, EEUU: Prentice-Hall.
- Czerkawski, J. W. (1986c). Techniques. In: *An Introduction to Rumen Studies* (Ed J. W. Czerkawski). Oxford, Reino Unido: Pergamon Press.
- Czerkawski, J. W. & Breckenridge, G. (1975). New inhibitors of methane production by rumen micro-organisms. Development and testing of inhibitors *in vitro*. *British Journal of Nutrition*. 34(03): 429-446.
- Czerkawski, J. W. & Breckenridge, G. (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*. 38(03): 371-384.
- Czerkawski, J. W. & Breckenridge, G. (1979). Experiments with the long-term rumen simulation technique (Rusitec); response to supplementation of basal rations. *British Journal of Nutrition*. 42(02): 217-228.
- Chaudhary, L. C., Srivastava, A. & Singh, K. K. (1995). Rumen fermentation pattern and digestion of structural carbohydrates in buffalo (*Bubalus bubalis*) calves as affected by ciliate protozoa. *Animal Feed Science and Technology*. 56(1-2): 111-117.
- Cheeke, P. R. & Dierenfeld, E. S. (2010). *Comparative Animal Nutrition and Metabolism*. Wallingford, Reino Unido: CABI Publishing.
- Chen, X. L., Wang, J. K., Wu, Y. M. & Liu, J. X. (2008). Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid- and solid-associated ruminal microbes *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. 141(1-2): 1-14.
- Cheng, K. J., Akin, D. E. & Costerton, J. W. (1977). Rumen bacteria: interaction with particulate dietary components and response to dietary variations. In: *Federation Proceedings*, Vol. 36, 193-197.
- Cheng, K. J. & Costerton, J. W. (1980). Adherent rumen bacteria. Their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. In: *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*, 227-250 (Eds Y. Ruckebush and P. Thivend). Lancaster, Reino Unido: MTP Press.
- Cheng, K. J. & McAllister, T. A. (1997). Compartmentation in the rumen. In: *The rumen microbial ecosystem*, 492-522 (Eds P. N. Hobson and C. S. Stewart). Londres, Reino Unido: Chapman and Hall.
- Cheng, K. J. & Wallace, R. J. (1979). The mechanism of passage of endogenous urea through the rumen wall and the role of ureolytic epithelial bacteria in the urea flux. *British Journal of Nutrition*. 42(3): 553-557.

- Chesson, A. & Forsberg, C. W. (1997). Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In: *The rumen microbial ecosystem*, 329-381 (Eds P. N. Hobson and C. S. Stewart). Londres, Reino Unido: Chapman and Hall.
- Chung, K. T. & Bryant, M. P. (1997). Robert E. Hungate: pioneer of anaerobic microbial ecology. *Anaerobe*. 3(4): 213-217.
- Davey, L. A., Cheeseman, G. C. & Briggs, C. A. E. (1960). Evaluation of an improved artificial rumen designed for continuous control during prolonged operation. *The Journal of Agricultural Science*. 55(02): 155-163.
- Davies, Z. S., Mason, D., Brooks, A. E., Griffith, G. W., Merry, R. J. & Theodorou, M. K. (2000). An automated system for measuring gas production from forages inoculated with rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes on grass silage. *Animal Feed Science and Technology*. 83(3-4): 205-221.
- 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(10): 3392-3398.
- Dehority, B. A. (1973). Hemicellulose degradation by rumen bacteria. In: *Federation Proceedings*, Vol. 32, 1819-1825.
- Dehority, B. A. (1998). Microbial interactions in the rumen. *Revista de La Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia*. 15: 69-86.
- Dehority, B. A. (2003). *Rumen Microbiology*. Nottingham, Reino Unido: Nottingham University Press
- Dehority, B. A. & Grubb, J. A. (1980). Effect of short-term chilling of rumen contents on viable bacterial numbers. *Applied and Environmental Microbiology*. 39(2): 376-381.
- Dehority, B. A. & Orpin, C. G. (1997). Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial population. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*, 196-245 (Eds P. N. Hobson and C. S. Stewart). Londres, Reino Unido: Chapman and Hall.
- Dehority, B. A. & Tirabasso, P. A. (2000). Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(7): 2921-2927.
- Dehority, B. A., Tirabasso, P. A. & Grifo Jr, A. P. (1989). Most-probable-number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 55(11): 2789-2792.
- Demeyer, D. I. & van Nevel, C. J. (1979). Effect of defaunation on the metabolism of rumen micro-organisms. *British Journal of Nutrition*. 42(3): 515-524.
- Denek, N. & Can, A. (2006). Feeding value of wet tomato pomace ensiled with wheat straw and wheat grain for Awassi sheep. *Small Ruminant Research*. 65(3): 260-265.
- Deng, W., Xi, D., Mao, H. & Wanapat, M. (2008). The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Molecular Biology Reports*. 35(2): 265-274.
- Denman, S. E. & McSweeney, C. S. (2005). Quantitative (real-time) PCR. In: *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants*, 105-115 (Eds H. P. S. Makkar and C. S. McSweeney). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Denman, S. E. & McSweeney, C. S. (2006). Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiology Ecology*. 58(3): 572-582.

- Denman, S. E., Tomkins, N. W. & McSweeney, C. S. (2007). Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology*. 62(3): 313-322.
- Devant, M., Ferret, A., Calsamiglia, S., Casals, R. & Gasa, J. (2001). Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Animal Science*. 79(7): 1944-1953.
- Devendra, C. & Lewis, D. (1974). The interaction between dietary lipids and fibre in the sheep 2. Digestibility studies. *Animal Science*. 19(01): 67-76.
- Dhanoa, M. S., France, J., Crompton, L. A., Mauricio, R. M., Kebreab, E., Mills, J. A. N., Sanderson, R., Dijkstra, J. & López, S. (2004). Technical note: A proposed method to determine the extent of degradation of a feed in the rumen from the degradation profile obtained with the *in vitro* gas production technique using feces as the inoculum. *Journal of Animal Science*. 82(3): 733-746.
- Di Francia, A., De Rosa, G., Masucci, F., Romano, R. & Grasso, F. (2004). Effetto dell'impiego alimentare del residuo industriale del passato di pomodoro sulle prestazioni produttive di pecore di razza Comisana. In: *Proceeding 16th National Congress SIPAOC*. Siena, Italy.
- Donefer, E., Crampton, E. W. & Lloyd, L. E. (1960). Prediction of the nutritive value index of a forage from *in vitro* rumen fermentation data. *Journal of Animal Science*. 19(2): 545-552.
- Dunbar, J., Barns, S. M., Ticknor, I. O. & Kuske, C. R. (2002). Empirical and theoretical bacterial diversity in four arizona soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(6): 3035-3045.
- Dunbar, J., Ticknor, L. O. & Kuske, C. R. (2000). Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(7): 2943-2950.
- Dunbar, J., Ticknor, L. O. & Kuske, C. R. (2001). Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of Terminal Restriction Fragment Profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(1): 190-197.
- Durand, M., Dumay, C., Beaumatin, P. & Morel, M. T. (1988). Use of the rumen simulation technique (RUSITEC) to compare microbial digestion of various by-products. *Animal Feed Science and Technology*. 21(2-4): 197-204.
- Durso, L. M., Harhay, G. P., Smith, T. P. L., Bono, J. L., DeSantis, T. Z., Harhay, D. M., Andersen, G. L., Keen, J. E., Laegreid, W. W. & Clawson, M. L. (2010). Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(14): 4858-4862.
- Eadie, J. M., Hobson, P. N. & Mann, S. O. (1959). A relationship between some bacteria, protozoa and diet in early weaned calves. *Nature*. 183(4661): 624-625.
- Edwards, J. E., McEwan, N. R., Travis, A. J. & Wallace, R. J. (2004). 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86: 263-281.
- Engebretson, J. J. & Moyer, C. L. (2003). Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(8): 4823-4829.

- Eugène, M., Archimède, H. & Sauvant, D. (2004a). Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livestock Production Science*. 85(1): 81-97.
- Eugène, M., Archimède, H., Weisbecker, J. L., Periacarpin, F., Saminadin, G. & Sauvant, D. (2004b). Effects of defaunation on digestion and growth, in sheep receiving a mixed diet (fresh *Digitaria decumbens* grass and concentrate) at four protein to energy ratios. *Animal Research*. 53(2): 111-125.
- Faith, D. P., Minchin, P. R. & Belbin, L. (1987). Compositional dissimilarity as a robust measure of ecological distance. *Plant Ecology*. 69(1-3): 57-68.
- FAOSTAT, 2009. Bases de datos de la FAO. Producción ganadera. <http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx#ancor>
- 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(8): 1815-1823.
- Ferris, M. J. & Ward, D. M. (1997). Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(4): 1375-1381.
- Fields, M. W., Mallik, S. & Russell, J. B. (2000). *Fibrobacter succinogenes* S85 ferments ball-milled cellulose as fast as cellobiose until cellulose surface area is limiting. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54(4): 570-574.
- Finlay, B. J., Esteban, G., Clarke, K. J., Williams, A. G., Embley, T. M. & Hirt, R. P. (1994). Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters*. 117(2): 157-161.
- Firkins, J. L., Karnati, S. K. R. & Yu, Z. (2008). Linking rumen function to animal response by application of metagenomics techniques. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48(7): 711-721.
- Firkins, J. L. & Yu, Z. (2006). Characterisation and quantification of the microbial populations of the rumen. In: *Ruminant Physiology, Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress*, 19-54 (Eds K. Sejrsen, T. Hvelplund and M. O. Nielsen). Wageningen, Países Bajos: Wageningen Academic Publishers.
- Fischer, S. G. & Lerman, L. S. (1979). Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*. 16(1): 191-200.
- Fischer, S. G. & Lerman, L. S. (1980). Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 77(8): 4420-4424.
- Flint, H. J., Bayer, E. A., Rincon, M. T., Lamed, R. & White, B. A. (2008). Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*. 6(2): 121-131.
- 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(1-2): 137-155.
- Fondevila, M. & Pérez-Espés, B. (2008). A new *in vitro* system to study the effect of liquid phase turnover and pH on microbial fermentation of concentrate diets for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 144(3-4): 196-211.

- Fonty, G., Gouet, P., Jouany, J. P. & Senaud, J. (1987). Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. *Journal of General Microbiology*. 133(7): 1835-1843.
- Fonty, G. & Joblin, K. N. (1990). Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. In: *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*, 655-680 (Eds T. Tsuda, Y. Sasaki and R. Kawashima). Orlando, FL, EEUU.
- Fonty, G., Senaud, J., Jouany, J. P. & Gouet, P. (1988). Establishment of ciliate protozoa in the rumen of conventional and conventionalized lambs: influence of diet and management conditions. *Canadian Journal of Microbiology*. 34(3): 235-241.
- 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(3): 528-537.
- Fox, G. E., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T. A., Wolfe, R. S., Balch, W. E., Tanner, R. S., Magrum, L. J., Zableau, L. B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B. J., Stahl, D. A., Luehrsen, K. R., Chen, K. N. & Woese, C. R. (1980). The phylogeny of prokaryotes. *Science*. 209(4455): 457-463.
- Frey, J. C., Angert, E. R. & Pell, A. N. (2006). Assessment of biases associated with profiling simple, model communities using terminal-restriction fragment length polymorphism-based analyses. *Journal of Microbiological Methods*. 67(1): 9-19.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvellé, S., Gillet, F., Aragno, M. & Rossi, P. (2002). Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*. 4(11): 634-643.
- Frostegard, A., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F., Jeannin, P., Nesme, X. & Simonet, P. (1999). Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(12): 5409-5420.
- Fuchigami, M., Senshu, T. & Horiguchi, M. (1989). A simple continuous culture system for rumen microbial digestion study and effects of defaunation and dilution rates. *Journal of Dairy Science*. 72(11): 3070-3078.
- Galbraith, E. A., Antonopoulos, D. A. & White, B. A. (2004). Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying genetic diversity in an environmental metagenome: the rumen as a model. *Environmental Microbiology*. 6(9): 928-937.
- Gargallo, S., Calsamiglia, S. & Ferret, A. (2006). Technical note: A modified three-step *in vitro* procedure to determine intestinal digestion of proteins. *Journal of Animal Science*. 84(8): 2163-2167.
- Gasa, J., Castrillo, C., Baucells, M. D. & Guada, J. A. (1989). By-products from the canning industry as feedstuff for ruminants: Digestibility and its prediction from chemical composition and laboratory bioassays. *Animal Feed Science and Technology*. 25(1-2): 67-77.
- Giraldo, L. A., Gutiérrez, L. A. & Rúa, C. (2007). Comparison between *in vitro* and *in situ* protocols for estimating true digestibility of several tropical forages. *Revista Colombiana de Ciencias Pecurias*. 20(3): 269-279.
- Giraldo, L. A., Tejido, M. L., Ranilla, M. J. & Carro, M. D. (2008). Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage: concentrate ratios. *Animal Feed Science and Technology*. 141(3-4): 306-325.

- Givens, D. I., De Boever, J. L. & Deaville, E. R. (1997). The principles, practices and some future applications of near infrared spectroscopy for predicting the nutritive value of foods for animals and humans. *Nutrition Research Reviews*. 10(01): 83-114.
- Gizzi, G., Zanchi, R. & Sciaraffia, F. (1998). Comparison of microbiological and fermentation parameters obtained with an improved rumen *in vitro* technique with those obtained *in vivo*. *Animal Feed Science and Technology*. 73(3-4): 291-305.
- Goad, D. W., Goad, C. L. & Nagaraja, T. G. (1998). Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *Journal of Animal Science*. 76(1): 234-241.
- Goering, M. K. & van Soest, P. J. (1970). *Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures, and some applications)*. Agricultural Handbook 379. Washington D.C., EEUU: USDA-ARS.
- Gonçalves, L. M. B. O. & Borba, A. E. S. (1996). Study of gas production capacity by three sources of inocula. *The Journal of Agricultural Science*. 127(04): 511-515.
- Gordon, G. L. & Phillips, M. W. (1989). Degradation and utilization of cellulose and straw by three different anaerobic fungi from the ovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 55(7): 1703-1710.
- Gordon, G. L. R. & Phillips, M. W. (1993). Removal of anaerobic fungi from the rumen of sheep by chemical treatment and the effect on feed consumption and *in vivo* fibre digestion. *Letters in Applied Microbiology*. 17(5): 220-223.
- Grant, A., Ogilvie, L. A., Blackwood, C. B., Marsh, T., Kim, S. H. & Paul, E. A. (2003). Letter to the editor: Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(10): 6342-6343.
- Griswold, K. E., Apgar, G. A., Bouton, J. & Firkins, J. L. (2003). Effects of urea infusion and ruminal degradable protein concentration on microbial growth, digestibility, and fermentation in continuous culture. *Journal of Animal Science*. 81(1): 329-336.
- Guan, L. L., Nkrumah, J. D., Basarab, J. A. & Moore, S. S. (2008). Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. *FEMS Microbiology Letters*. 288: 85-91.
- Gulati, S. K., Scott, T. W. & Ashes, J. R. (1997). *In vitro* assessment of fat supplements for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 64(2-4): 127-132.
- Hannah, S. M., Stern, M. D. & Ehle, F. R. (1986). Evaluation of a dual flow continuous culture system for estimating bacterial fermentation *in vivo* of mixed diets containing various soya bean products. *Animal Feed Science and Technology*. 16(1-2): 51-62.
- Hernandez-Sanabria, E., Guan, L. L., Goonewardene, L. A., Li, M., Mujibi, D. F., Stothard, P., Moore, S. S. & Leon-Quintero, M. C. (2010). Correlation of particular bacterial PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis patterns with bovine ruminal fermentation parameters and feed efficiency traits. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(19): 6338-6350.
- Herrera, P., Kwon, Y. M. & Ricke, S. C. (2009). Ecology and pathogenicity of gastrointestinal *Streptococcus bovis*. *Anaerobe*. 15(1-2): 44-54.
- Hespell, R. B., Akin, D. E. & Dehority, B. A. (1997). Bacteria, fungi, and protozoa of the rumen. In: *Gastrointestinal Microbiology v 2: Gastrointestinal Microbes and Host Interactions*, Vol. 2, 59-141 (Eds R. I. Mackie, B. A. White and R. E. Isaacson). Nueva York, EEUU: Chapman and Hall.

- Hewson, I. & Fuhrman, J. A. (2006). Improved strategy for comparing microbial assemblage fingerprints. *Microbial Ecology*. 51(2): 147-153.
- Hillman, D. L. K., Yarlett, N. & Williams, A. G. (1989). Hydrogen production by rumen holotrich protozoa: effects of oxygen and implications for metabolic control by *in situ* conditions. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 36(2): 205-213.
- Hillman, K., Lloyd, D. & Williams, A. G. (1988). Interactions between the methanogen *Methanosarcina barkeri* and rumen holotrich ciliate protozoa. *Letters in Applied Microbiology*. 7(3): 49-53.
- Hillman, K., Williams, A. G. & Lloyd, D. (1991). Evaluation of matrices in the rumen simulation technique (RUSITEC) for the maintenance of ciliate protozoa. *Letters in Applied Microbiology*. 12(4): 129-132.
- 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(3): 642-648.
- Hino, T., Sugiyama, M. & Okumura, K. (1993). Maintenance of protozoa and methanogens, and fiber digestion in rumen-simulating continuous culture. *Journal of General and Applied Microbiology*. 39(1): 35-45.
- Hobson, P. N., Mann, S. O. & Summers, R. (1976). Rumen micro-organisms in red deer, hill sheep and reindeer in the scottish highlands. *Proceedings-Royal Society of Edinburgh. Section B: Natural environment*. 75(3): 171-180.
- Hooper, L. V. & Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292(5519): 1115-1118.
- Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G. & Gordon, J. I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*. 291(5505): 881-884.
- 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(2): 528-534.
- Hoover, W. H., Kincaid, C. R., Varga, G. A., Thayne, W. V. & Junkins, L. L., Jr. (1984). Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. IV. pH and dilution rate. *Journal of Animal Science*. 58(3): 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(2): 535-542.
- Hoover, W. H., Tucker, C., Harris, J., Sniffen, C. J. & de Ondarza, M. B. (2006). Effects of nonstructural carbohydrate level and starch:sugar ratio on microbial metabolism in continuous culture of rumen contents. *Animal Feed Science and Technology*. 128(3-4): 307-319.
- Hongoh Y., Yuzawa H., Ohkuma M. & Kudo T. (2003). Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiology Letters*. 221(2): 299-304.
- Horz, H. P., Rotthauwe, J. H., Lukow, T. & Liesack, W. (2000). Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of *amoA* PCR products. *Journal of Microbiological Methods*. 39(3): 197-204.

- Huhtanen, P., Ahvenjärvi, S., Weisbjerg, M. R. & Nørgaard, P. (2006). Digestion and passage of fibre in ruminants. In: *Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*, 87-136 (Eds K. Sejrsen, T. Hvelplund and M. O. Nielsen). Wageningen, Países Bajos: Wageningen Academic Publishers.
- Hungate, R. E. (1966). *The Rumen and its Microbes*. Nueva York, EEUU: Academic Press.
- Hungate, R. E. & Macy, J. (1973). The roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. *Bulletins from the Ecological Research Committee*. 17: 123-126.
- Infoagro.com. Gestión y tratamiento de residuos agrícolas (1ª parte). http://www.infoagro.com/hortalizas/residuos_agricolas.htm
- Janssen, P. H. & Kirs, M. (2008). Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(12): 3619-3625.
- Johnson, K. A. & Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*. 73(8): 2483-2492.
- Jones, D. I. H. & Hayward, M. V. (1975). The effect of pepsin treatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulase solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 26: 711-718.
- Jones, D. I. H. & Theodorou, M. K. (2000). Enzyme techniques for estimating digestibility. In: *Forage evaluation in ruminant nutrition*, 155-173 (Eds D. I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford and H. M. Omed). Wallingford, Reino Unido: CAB International.
- Jouany, J. P. (1982). Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sciences des Aliments*. 2: 131-144.
- Jouany, J. P. & Thivend, P. (1986). *In vitro* effects of avoparcin on protein degradability and rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 15(3): 215-229.
- Jouany, J. P. & Ushida, K. (1990). Protozoa and fibre digestion in the rumen. In: *The Rumen Ecosystem: The Microbial Metabolism and Its Regulation*, 139-150 (Eds S. Hoshino, R. Onodera, H. Minato and H. Itabashi). Japan Scientific Societies Press.
- Jouany, J. P. & Ushida, K. (1999). The role of protozoa in feed digestion. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 12(1): 113-128.
- Kalmokoff, M. L., Lu, D., Whitford, M. F. & Teather, R. M. (1999). Evidence for production of a new lantibiotic (Butyrivibriocin OR79A) by the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* OR79: Characterization of the structural gene encoding Butyrivibriocin OR79A. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(5): 2128-2135.
- Kamra, D. N. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Current Science*. 89(1): 124-135.
- Kamra, D. N., Saha, S., Bhatt, N., Chaudhary, L. C. & Agarwal, N. (2003). Effect of diet on enzyme profile, biochemical changes and *in sacco* degradability of feeds in the rumen of buffalo. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 16(3): 374-379.
- Karnati, S. K. R., Yu, Z., Sylvester, J. T., Dehority, B. A., Morrison, M. & Firkins, J. L. (2003). Technical note: Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. *Journal of Animal Science*. 81(3): 812-815.
- Kay, R. N. B., Engelhardt, W. V. & White, R. G. (1980). The digestive physiology of wild ruminants. In: *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants* (Eds Y. Ruckebusch and P. Thivend). Lancaster, Reino Unido: MTP Press.

- Kent, A. D., Smith, D. J., Benson, B. J. & Triplett, E. W. (2003). Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(11): 6768-6776.
- Khafipour, E., Li, S., Plaizier, J. C. & Krause, D. O. (2009). Rumen Microbiome Composition Determined Using Two Nutritional Models of Subacute Ruminal Acidosis. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(22): 7115-7124.
- Khazaal, K., Dentinho, M. T., Ribeiro, J. M. & Ørskov, E. R. (1993). A comparison of gas production during incubation with rumen contents *in vitro* and nylon bag degradability as predictors of the apparent digestibility *in vivo* and the voluntary intake of hays. *Animal Science*. 57(01): 105-112.
- Kim, K. S., Ko, K. S., Chang, M. W., Hahn, T. W., Hong, S. K. & Kook, Y. H. (2003). Use of *rpoB* sequences for phylogenetic study of *Mycoplasma* species. *FEMS Microbiology Letters*. 226(2): 299-305.
- Kimura, M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*. 217(5129): 624-626.
- King, J. & Plaizier, J. C. (2006). Effects of source of rumen fluid on *in vitro* dry matter digestibility of feeds determined using the DAISYII incubator. *Canadian Journal of Animal Science*. 86(3): 439-441.
- Kitessa, S., Flinn, P. C. & Irish, G. G. (1999). Comparison of methods used to predict the *in vivo* digestibility of feeds in ruminants. *Australian Journal of Agricultural Research*. 50(5): 825-842.
- Kitts, C. L. (2001). Terminal restriction fragment patterns: A tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 2(1): 17-25.
- Klieve, A. V. & Bauchop, T. (1988). Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(6): 1637-1641.
- Klieve, A. V. & Hegarty, R. S. (1999). Opportunities for biological control of ruminal methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research*. 50(8): 1315-1320.
- Klieve, A. V. & Swain, R. A. (1993). Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsed-field gel electrophoresis and laser densitometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(7): 2299-2303.
- Kobayashi, Y., Shinkai, T. & Koike, S. (2008). Ecological and physiological characterization shows that *Fibrobacter succinogenes* is important in rumen fiber digestion — Review. *Folia Microbiologica*. 53(3): 195-200.
- Koch, M., Strobel, E., Tebbe, C. C., Heritage, J., Breves, G. & Huber, K. (2006). Transgenic maize in the presence of ampicillin modifies the metabolic profile and microbial population structure of bovine rumen fluid *in vitro*. *British Journal of Nutrition*. 96(05): 820-829.
- Kocherginskaya, S. A., Aminov, R. I. & White, B. A. (2001). Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe*. 7(3): 119-134.
- Koenig, K. M., Newbold, C. J., McIntosh, F. M. & Rode, L. M. (2000). Effects of protozoa on bacterial nitrogen recycling in the rumen. *Journal of Animal Science*. 78(9): 2431-2445.

- Koike, S. & Kobayashi, Y. (2001). Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*. 204(2): 361-366.
- Koike, S., Pan, J., Kobayashi, Y. & Tanaka, K. (2003a). Kinetics of *in sacco* fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *Journal of Dairy Science*. 86(4): 1429-1435.
- Koike, S., Yabuki, H. & Kobayashi, Y. (2007). Validation and application of real-time polymerase chain reaction assays for representative rumen bacteria. *Animal Science Journal*. 78(2): 135-141.
- Koike, S., Yoshitani, S., Kobayashi, Y. & Tanaka, K. (2003b). Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 229(1): 23-30.
- Kong, Y., Teather, R. & Forster, R. (2010). Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS Microbiology Ecology*. 74(3): 612-622.
- Kopečný, J., Hodrová, B. & Stewart, C. S. (1996). The effect of rumen chitinolytic bacteria on cellulolytic anaerobic fungi. *Letters in Applied Microbiology*. 23(3): 199-202.
- Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., De Boer, W., Prosser, J. I., Embley, T. M. & Woldendorp, J. W. (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(4): 1489-1497.
- Krause, D. O. & Russell, J. B. (1996). How many ruminal bacteria are there? *Journal of Dairy Science*. 79: 1467-1475.
- Krause, D. O., Dalrymple, B. P., Smith, W. J., Mackie, R. I. & McSweeney, C. S. (1999). 16S rDNA sequencing of *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*: design of a signature probe and its application in adult sheep. *Microbiology*. 145(7): 1797-1807.
- Krause, D.O., Denman, S.E., Mackie, R.I., Morrison, M., Rae, A.L., Attwood, G.T. & McSweeney, C.S., 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews*. 27(5), 663-693.
- Kung Jr, L., Kreck, E. M., Tung, R. S., Hession, A. O., Sheperd, A. C., Cohen, M. A., Swain, H. E. & Leedle, J. A. Z. (1997). Effects of a live yeast culture and enzymes on *in vitro* ruminal fermentation and milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 80(9): 2045-2051.
- Lana, R. P., Russell, J. B. & Va Amburgh, M. E. (1998). The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *Journal of Animal Science*. 76(8): 2190-2196.
- Larue, R., Yu, Z., Parisi, V. A., Egan, A. R. & Morrison, M. (2005). Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and *rrs* gene sequencing. *Environmental Microbiology*. 7(4): 530-543.
- Látal, O., Pozdisek, J., Pechová, A. & Stybnarova, M. (2007). Influence of different rate of triticale meal in diet on ruminal protozoa number in cattle. *Vyzkum v Chovu Skotu*. 49(4): 30-33.

- Latham, M. J. (1980). Adhesion of rumen bacteria to plant cell walls. In: *Microbial Adhesion to Surfaces*, 339-350 (Eds R. C. W. Berkeley, J. M. Lynch, J. Melliney, R. P. Rutter and B. Vincent). Chichester, Reino Unido: Ellis Harwood Ltd.
- Lederberg, J. & McCray, A. T. (2001). 'Ome Sweet 'Omics - a genealogical treasury of words. *Scientist*. 15(7): 8.
- 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(2): 402-412.
- Legendre, P. & Legendre, L. (1998). *Numerical ecology*. Amsterdam, Países Bajos: Elsevier, 2nd Edition.
- Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R. & Gordon, J. I. (2008). Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*. 6(10): 776-788.
- Ley, R. E., Peterson, D. A. & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*: 837-848.
- Lin, C., Raskin, L. & Stahl, D. A. (1997). Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology*. 22: 281-294.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H. & Forney, L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(11): 4516-4522.
- López, S. (2005). *In vitro* and *in situ* techniques for estimating digestibility. In: *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism* (Eds J. Dijkstra, J. M. Forbes and J. France). Wallingford, Reino Unido: CABI Publishing.
- Lourenço, M., Ramos-Morales, E. & Wallace, R. J. (2010). The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal*. 4(Special Issue 07): 1008-1023.
- Luehrsen, K. R., Nicholson, D. E. & Fox, G. E. (1985). Widespread distribution of a 7S RNA in Archaeobacteria. *Current Microbiology*. 12(2): 69-72.
- Mackie, R. I. (1997). Gut environment and evolution of mutualistic fermentative digestion. In: *Gastrointestinal Microbiology v1: Gastrointestinal ecosystems and fermentations*, Vol. 1, 13-35 (Eds R. I. Mackie and B. A. White). Nueva York, EEUU: Chapman and Hall.
- Mackie, R. I. & Gilchrist, F. M. C. (1979). Changes in lactate-producing and lactate-utilizing bacteria in relation to pH in the rumen of sheep during stepwise adaptation to a high-concentrate diet. *Applied and Environmental Microbiology*. 38(3): 422-430.
- Mackie, R. I., Gilchrist, F. M. C., Robberts, A. M., Hannah, P. E. & Schwartz, H. M. (1978). Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *The Journal of Agricultural Science*. 90(02): 241-254.
- Mackie, R. I., McSweeney, C. S. & Klieve, A. V. (2002). Microbial ecology of the ovine rumen. In: *Sheep nutrition*, 71-94 (Eds M. Freer and H. Dove). Oxon, NY, EEUU: CABI Publishing.

- Macnaughton, S. J. & Stephen, J. R. (2001). A combined phospholipid and 16S rDNA PCR-DGGE analysis to study bioremediative microbial communities *in situ*. In: *Environmental molecular microbiology: Protocols and applications*, 141-160 (Ed P. A. Rochelle). Wymondham, Reino Unido: Horizon Scientific Press.
- Madsen, E. L. (2008). *Environmental Microbiology: from Genomes to Biogeochemistry*. Oxford, Reino Unido: Blackwell Publishing.
- Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Kokeyuchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F. & Takashiba, S. (2003). Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 39(1): 81-86.
- Magurran, A. E., 1988. *Ecological Diversity and Its Measurement*. Londres, Reino Unido: Chapman and Hall.
- Malburg, L. M. & Forsberg, C. W. (1993). *Fibrobacter succinogenes* possesses at least nine distinct glucanase genes. *Canadian Journal of Microbiology*. 39: 882-891.
- Malburg, L. M., Smith, D. C., Schellhorn, H. E. & Forsberg, C. W. (1993). *Fibrobacter succinogenes* S85 has multiple xylanase genes. *Journal of Applied Microbiology*. 75(6): 564-573.
- 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(1-2): 47-66.
- Mansfield, H. R., Stern, M. D. & Otterby, D. E. (1994). Effects of beet pulp and animal by-products on milk yield and *in vitro* fermentation by rumen microorganisms. *Journal of Dairy Science*. 77(1): 205-216.
- Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*. 24(3): 133-141.
- MARM, 2009. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Anuario de Estadística 2009. <http://www.marm.es/es/estadistica/temas/anuario-de-estadistica/2009/default.aspx>
- MARM, 2010. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Observatorio de precios origen - destino en alimentación. Tomate redondo liso. http://www.marm.es/es/estadistica/temas/observatorio-de-precios-origen-destino-en-alimentacion/Tomate_tcm7-14505.pdf
- MARM, 2011. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Boletín Mensual de Estadística: Marzo 2011. http://www.marm.es/es/estadistica/temas/publicaciones/Boletin_Mensual_de_Estadistica_2011-03_tcm7-152337.pdf
- Marsh, T. L. (1999). Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology*. 2(3): 323-327.
- Marten, G. C. & Barnes, R. F. (1980). Prediction of energy digestibility of forages with *in vitro* rumen fermentation and fungal enzyme systems. In: *Workshop on Standardization of Analytical Methodology for Feeds*, 61-71 (Eds W. J. Pigden, C. C. Balch and M. Graham). Ottawa, ON, Canadá: IDRC.

- Martín-García, A. I. (2001). Potencial de la hoja de olivo y del orujo de dos fases como alimentos para ovino y caprino. Valoración nutritiva mediante técnicas de simulación. Tesis doctoral. Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal (Estación Experimental del Zaidín, CSIC) y Universidad de Granada.
- Martín-García, A. I., Moumen, A., Yáñez-Ruiz, D. R. & Molina-Alcaide, E. (2003). Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology*. 107(1-4): 61-74.
- Martín-García, I., Yáñez-Ruiz, D., Moumen, A. & Molina-Alcaide, E. (2006). Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal on olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaf fermentation in continuous fermentors. *Small Ruminant Research*. 61(1): 53-61.
- Martín-Orúe, S. M., Balcells, J., Zakraoui, F. & Castrillo, C. (1998). Quantification and chemical composition of mixed bacteria harvested from solid fractions of rumen digesta: effect of detachment procedure. *Animal Feed Science and Technology*. 71(3-4): 269-282.
- Martin, C., Morgavi, D. P. & Doreau, M. (2010). Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*. 4(03): 351-365.
- Martínez, M. E., Ranilla, M. J., Ramos, S., Tejido, M. L. & Carro, M. D. (2009). Effects of dilution rate and retention time of concentrate on efficiency of microbial growth, methane production, and ruminal fermentation in Rusitec fermenters. *Journal of Dairy Science*. 92(8): 3930-3938.
- Martínez, M. E., Ranilla, M. J., Ramos, S., Tejido, M. L. & Carro, M. D. (en prensa). Evolution of fermentation parameters in Rusitec fermenters operated at different dilution rates and concentrate retention times. *Options Méditerranéennes*.
- Martínez, M. E., Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Ramos, S. & Carro, M. D. (2010a). Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. I. Digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. *Journal of Dairy Science*. 93(8): 3684-3698.
- Martínez, M. E., Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Saro, C. & Carro, M. D. (2010b). Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. II. Protozoa population and diversity of bacterial communities. *Journal of Dairy Science*. 93(8): 3699-3712.
- Mauricio, R. M., Mould, F. L., Dhanoa, M. S., Owen, E., Channa, K. S. & Theodorou, M. K. (1999). A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology*. 79(4): 321-330.
- Mauricio, R. M., Owen, E., Mould, F. L., Givens, I., Theodorou, M. K., France, J., Davies, D. R. & Dhanoa, M. S. (2001). Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an *in vitro* gas production technique for evaluating forages. *Animal Feed Science and Technology*. 89(1-2): 33-48.
- McAllister, T. A., Bae, H. D., Jones, G. A. & Cheng, K. J. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science*. 72(11): 3004-3018.
- McAllister, T. A., Cheng, K. J., Okine, E. K. & Mathison, G. W. (1996). Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*. 76(2): 231-243.

- McBee, R. H. (1953). Manometric method for the evaluation of microbial activity in the rumen with application to utilization of cellulose and hemicelluloses. *Applied Microbiology*. 1(2): 106-110.
- McCune, B., Grace, J. B. & Urban, D. L. (2002). *Analysis of Ecological Communities*. Glenden Beach, OR, EEUU: MjM Software Design.
- McDougall, E. I. (1948). Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal*. 43(1): 99-109.
- McSweeney, C. S. & Denman, S. E. (2007). Effect of sulfur supplements on cellulolytic rumen micro-organisms and microbial protein synthesis in cattle fed a high fibre diet. *Journal of Applied Microbiology*. 103(5): 1757-1765.
- Mena-Guerrero, Y., Castel-Genís, J. M., Caravaca-Rodríguez, F. P., Guzmán-Guerrero, J. L. & González-Redondo, P. (2005). *Situación actual, evolución y diagnóstico de los sistemas semiextensivos de producción caprina en Andalucía centro-occidental*. Sevilla, España: Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca.
- Mendoza, G. D., Britton, R. A. & Stock, R. A. (1993). Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. *Journal of Animal Science*. 71(6): 1572-1578.
- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *The Journal of Agricultural Science*. 93(01): 217-222.
- Menke, K. H. & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*. 28: 7-55.
- 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(03): 701-709.
- Mertens, D. R. & Weimer, P. J. (1998). Method for measuring gas production kinetics. In: *In Vitro Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants*, BSAS Occasional Publication N°22 (Eds E. R. Deaville, E. Owen, A. T. Adesogan, C. Rymer, J. A. Huntington and T. L. J. Lawrence). Edimburgo, Reino Unido: BSAS.
- Mertens, D. R., Weimer, P. J. & Waghorn, G. M. (1998). Inocula differences affect *in vitro* gas production kinetics. In: *In Vitro Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants*, BSAS Occasional Publication N°22, 95-98 (Eds E. R. Deaville, E. Owen, A. T. Adesogan, C. Rymer, J. A. Huntington and T. L. J. Lawrence). Edimburgo, Reino Unido: BSAS.
- Michalet-Doreau, B., Fernandez, I. & Fonty, G. (2002). A comparison of enzymatic and molecular approaches to characterize the cellulolytic microbial ecosystems of the rumen and the cecum. *Journal of Animal Science*. 80(3): 790-796.
- Michalet-Doreau, B., Fernandez, I., Peyron, C., Millet, L. & Fonty, G. (2001). Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reproduction Nutrition Development*. 41(2): 187-194.
- Miettinen, H. & Setälä, J. (1989). Design and development of a continuous culture system for studying rumen fermentation. *Journal of Agricultural Science in Finland*. 61: 463-473.

- Minato, H., Endo, A., Higuchi, M., Comoto, Y. & Vemura, T. (1966). Ecological treatise on the rumen fermentation. I. The fractionation of bacteria attached to the rumen digesta solids. *Journal of General Applied Microbiology*. 12: 39-52.
- Minato, H., Ishibashi, S. & Hamaoka, T. (1988). Cellular fatty acid and sugar composition of representative strains of rumen bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology*. 34(4): 303-319.
- Minato, H., Mitsumori, M. & Cheng, K. J. (1993). Attachment of microorganisms to solid substrate in the rumen. In: *Genetics, Biochemistry and Ecology of Lignocellulose Degradation* 139-145 (Eds K. Shimada, K. Ohmiya, Y. Kobayashi, S. Hoshino, K. Sakka and S. Karita).
- Minson, D. J. (1982). Effect of chemical composition on feed digestibility and metabolizable energy. *Nutrition Abstracts and Reviews. Series B: Livestock Feeds and Feeding*. 52(10): 591-615.
- Miron, J., Ben-Ghedalia, D. & Morrison, M. (2001). Invited Review: Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria. *Journal of Dairy Science*. 84(6): 1294-1309.
- Moir, R. J. (1965). The comparative physiology of ruminant-like animals. In: *Physiology of Digestion in the Ruminant*, 1-14 (Ed R. W. Dougherty). Londres, Reino Unido. Butterworths.
- Molero, R., Ibars, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Losa, R. (2004). Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. *Animal Feed Science and Technology*. 114(1-4): 91-104.
- 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(1): 39-47.
- Molina-Alcaide, E., Morales-García, E. Y., Martín-García, A. I., Ben Salem, H., Nefzaoui, A. & Sanz-Sampelayo, M. R. (2010). Effects of partial replacement of concentrate with feed blocks on nutrient utilization, microbial N flow, and milk yield and composition in goats. *Journal of Dairy Science*. 93(5): 2076-2087.
- Molina-Alcaide, E., Moumen, A. & Martín-García, A. I. (2008). By-products from viticulture and the wine industry: potential as sources of nutrients for ruminants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88(4): 597-604.
- Molina-Alcaide, E., Moumen, A., Martín-García, I. & Carro, M. D. (2009a). Comparison of bacterial pellets and microbial markers for the estimation of the microbial nitrogen and amino acids flows from single flow continuous culture fermenters fed diets containing two-stage olive cake. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 93(5): 527-537.
- Molina-Alcaide, E., Pascual, M. R., Cantalapiedra-Hijar, G., Morales-García, E. Y. & Martín-García, A. I. (2009b). Effects of concentrate replacement by feed blocks on ruminal fermentation and microbial growth in goats and single-flow continuous-culture fermenters. *Journal of Animal Science*. 87(4): 1321-1333.
- 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.

- Morales, A. R., Galina, M. A., Jimenez, S. & Haenlein, G. F. W. (2000). Improvement of biosustainability of a goat feeding system with key supplementation. *Small Ruminant Research*. 35(2): 97-105.
- Morand-Fehr, P., Boutonnet, J. P., Devendra, C., Dubeuf, J. P., Haenlein, G. F. W., Holst, P., Mowlem, L. & Capote, J. (2004). Strategy for goat farming in the 21st century. *Small Ruminant Research*. 51: 175-183.
- Morgavi, D. P., Jouany, J. P., Martin, C. & Ranilla, M. J. (2006). Archaeal community structure diversity in the rumen of faunated and defaunated sheep. In: *Proceedings of the 2nd International Conference on Greenhouse Gases and Animal Agriculture*, Vol. 1293, 127-130 Zurich, Suiza. International Congress Series: Greenhouse Gases and Animal Agriculture.
- Morgavi, D. P., Sakurada, M., Tomita, Y. & Onodera, R. (1994). Presence in rumen bacterial and protozoal populations of enzymes capable of degrading fungal cell walls. *Microbiology*. 140(3): 631-636.
- Mosoni, P., Chaucheyras-Durand, F., Bera-Maillet, C. & Forano, E. (2007). Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *Journal of Applied Microbiology*. 103(6): 2676-2685.
- Mould, F. L. & Nordheim, H. (1998). Dry matter and NDF degradation profiles of roughages obtained using the ANKOM *in vitro* system. In: *In vitro Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants*, BSAS Occasional Publication N^o22, 329-331 (Eds E. R. Deaville, E. Owen, A. T. Adesogan, C. Rymer, J. A. Huntingdon and T. L. J. Lawrence). Edimburgo, Reino Unido: BSAS.
- Moumen, A. (2003). Valoración nutritiva, mediante técnicas de simulación, de dietas para pequeños ruminantes basadas en orujo de dos fases u hoja de olivo. Potencial predictivo. Tesis doctoral. Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal (Estación Experimental del Zaidín, CSIC) y Universidad de Granada.
- Moumen, A., Yáñez-Ruiz, D. R., Carro, M. D. & Molina-Alcaide, E. (2009). Protozoa evolution in single-flow continuous culture and Rusitec fermenters fed high-forage diets. *Options Méditerranéenes*. 85: 303-308.
- Moumen, A., Yáñez-Ruiz, D. R., Martín-García, I. & Molina-Alcaide, E. (2008). Fermentation characteristics and microbial growth promoted by diets including two-phase olive cake in continuous fermenters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 92(1): 9-17.
- Mouriño, F., Akkarawongsa, R. & Weimer, P. J. (2001). Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *Journal of Dairy Science*. 84(4): 848-859.
- Moya, D. (2011). Estrategias alternativas al uso de antibióticos para prevenir la aparición de trastornos digestivos en terneros de engorde. Tesis doctoral. Departament de Ciència Animal i dels Aliments (Universitat Autònoma de Barcelona).
- Muetzel, S., Hoffmann, E. M. & Becker, K. (2003). Supplementation of barley straw with *Sesbania pachycarpa* leaves *in vitro*: effects on fermentation variables and rumen microbial population structure quantified by ribosomal RNA-targeted probes. *British Journal of Nutrition*. 89(04): 445-453.
- Muetzel, S., Lawrence, P., Hoffmann, E. M. & Becker, K. (2009). Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. *Animal Feed Science and Technology*. 151(1-2): 32-43.

- Murray, A. E., Hollibaugh, J. T. & Orrego, C. (1996). Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(7): 2676-2680.
- Murtagh, F. (1984). Structure of hierarchic clusterings: implications for information retrieval and for multivariate data analysis. *Information Processing & Management*. 20(5-6): 611-617.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(3): 695-700.
- Muyzer, G. & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73(1): 127-141.
- Myers, R. M., Fischer, S. G., Lerman, L. S. & Maniatis, T. (1985). Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*. 13(9): 3131-3145.
- Neufeld, J. D., Yu, Z., Lam, W. & Mohn, W. W. (2004). Serial analysis of ribosomal sequence tags (SARST): a high-throughput method for profiling complex microbial communities. *Environmental Microbiology*. 6(2): 131-144.
- Newbold, C. J., Wallace, R. J., Chen, X. B. & McIntosh, F. M. (1995). Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. *Journal of Animal Science*. 73(6): 1811-1818.
- Nicholson, J. K., Holmes, E. & Wilson, I. D. (2005). Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nature Reviews Microbiology*. 3(5): 431-438.
- Nsahlai, I. V. & Umunna, N. N. (1996). Comparison between reconstituted sheep faeces and rumen fluid inocula and between *in vitro* and *in sacco* digestibility methods as predictors of intake and *in vivo* digestibility. *The Journal of Agricultural Science*. 126(02): 235-248.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., Ludwig, W. & Backhaus, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*. 178(19): 5636-5643.
- Odenyo, A. A., Mackie, R. I., Stahl, D. A. & White, B. A. (1994). The use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to study competition between ruminal fibrolytic bacteria: development of probes for *Ruminococcus species* and evidence for bacteriocin production. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(10): 3688-3696.
- Ogimoto, K. & Imain, S. (1981). Rumen bacteria. In: *Atlas of Rumen Microbiology*, Vol. 35, 22-27. Japan: Japan Society Press.
- Ohkuma, M., Noda, S. & Kudo, T. (1999). Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(11): 4926-4934.
- Orpin, C. G. (1981). Isolation of cellulolytic phycomycete fungi from the caecum of the horse. *Journal of General Microbiology*. 123: 187-196.

- 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(2-3): 121-143.
- Orpin, C. G. (1994). Anaerobic fungi: taxonomy, biology and distribution in nature. In: *Anaerobic Fungi: Biology, Ecology and Function*, 1-46 (Eds D. O. Mountford and C. G. Orpin). Nueva York, EEUU: Marcel Dekker.
- Orpin, C. G. & Bountiff, L. (1978). Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology*. 104(1): 113-122.
- Orpin, C. G. & Joblin, K. N. (1997). The rumen anaerobic fungi. In: *The rumen microbial ecosystem*, 140-184 (Eds P. N. Hobson and C. S. Stewart). Londres, Reino Unido: Chapman and Hall.
- Orpin, C. G., Mathiesen, S. D., Greenwood, Y. & Blix, A. S. (1985). Seasonal changes in the ruminal microflora of the high-arctic Svalbard reindeer (*Rangifer tarandus platyrhynchus*). *Applied and Environmental Microbiology*. 50(1): 144-151.
- Orpin, C. G. & Munn, E. A. (1974). The occurrence of bacteriophages in the rumen and their influence on rumen bacterial populations. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 30(9): 1018-1020.
- Ørskov, E. R. (1980). Nutritional principles in utilization of waste and by-products. In *By-Products and Wastes in Animal Nutrition*, Occasional Publication nº 3, 13-17. BSAP.
- Ørskov, E. R. & Ryle, M. (1990). *Energy nutrition in ruminants*. Elsevier Science Publishers Ltd.
- Osborn, A. M., Moore, E. R. B. & Timmis, K. N. (2000). An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*. 2(1): 39-50.
- Ozutsumi, Y., Tajima, K., Takenaka, A. & Itabashi, H. (2005). The effect of protozoa on the composition of rumen bacteria in cattle using 16S rRNA gene clone libraries. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 69(3): 499-506.
- Palmonari, A., Stevenson, D. M., Mertens, D. R., Cruywagen, C. W. & Weimer, P. J. (2010). pH dynamics and bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 93(1): 279-287.
- Payne, J. S., Hamersley, A. R., NMilligan, J. C. & Huntington, J. A. (2002). The effect of rumen fluid collection time on its fermentative capacity and the stability of rumen conditions in sheep fed a constant diet. *Proceedings of the British Society of Animal Science*. 165.
- Paynter, M. J. B., Ewert, D. L. & Chalupa, W. (1969). Some morphological types of bacteriophages in bovine rumen contents. *Applied Microbiology*. 18(5): 942-943.
- Peixoto, R. S., Da Costa Coutinho, H. L., Rumjanek, N. G., Macrae, A. & Rosado, A. S. (2002). Use of rpoB and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Letters in Applied Microbiology*. 35(4): 316-320.
- Pell, A. N. & Schofield, P. (1993). Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *Journal of Dairy Science*. 76(4): 1063-1073.
- Perumbakkam, S. & Craig, A. M. (2011). Design and *in vitro* evaluation of new rpoB-DGGE primers for ruminants. *FEMS Microbiology Ecology*. 76(1): 156-169.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29(9): 2002-2007.

- Possemiers, S., Verthé, K., Uyttendaele, S. & Verstraete, W. (2004). PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology* 49(3): 495-507.
- Pounden, W. D. & Hibbs, J. W. (1948). The influence of the ration and rumen inoculation on the establishment of certain microorganisms in the rumens of young calves. *Journal of Dairy Science*. 31(12): 1041-1050.
- Prevot, S., Senaud, J., Bohatier, J. & Prensier, G. (1994). Variation in the composition of the ruminal bacterial microflora during the adaptation phase in an artificial fermentor (Rusitec). *Zoological Science*. 11: 871-871.
- 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(02): 155-163.
- Prigge, E. C., Baker, M. J. & Varga, G. A. (1984). Comparative Digestion, Rumen Fermentation and Kinetics of Forage Diets by Steers and Wethers. *Journal of Animal Science*. 59(1): 237-245.
- Qiu, X., Eastridge, M. L., Griswold, K. E. & Firkins, J. L. (2004). Effects of substrate, passage rate, and pH in continuous culture on flows of conjugated linoleic acid and trans C18:1. *Journal of Dairy Science*. 87(10): 3473-3479.
- Raab, L., Cafantaris, B., Jilg, T. & Menke, K. H. (1983). Rumen protein degradation and biosynthesis. *British Journal of Nutrition*. 50(03): 569-582.
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*. 62(2): 142-160.
- Ramos, S., Ranilla, M. J., Martínez, M. E., Saro, C., Tejido, M. L. & Carro, M. D. (2009). Efecto de la relación forraje: concentrado y del tipo de forraje de la dieta sobre las comunidades bacterianas del rumen de ovejas. In: *XIII Jornadas sobre Producción Animal*, Vol. 1, 760-762. Zaragoza, España: Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario.
- Ramšak, A., Peterka, M., Tajima, K., Martin, J. C., Wood, J., Johnston, M. E. A., Aminov, R. I., Flint, H. J. & Avguštin, G. (2000). Unravelling the genetic diversity of ruminal bacteria belonging to the CFB phylum. *FEMS Microbiology Ecology*. 33(1): 69-79.
- Raskin, L., Zheng, D., Griffin, M. E., Stroot, P. G. & Misra, P. (1995). Characterization of microbial communities in anaerobic bioreactors using molecular probes. *Antonie van Leeuwenhoek*. 68(4): 297-308.
- Rees, G. N., Baldwin, D. S., Watson, G. O., Perryman, S. & Nielsen, D. L. (2004). Ordination and significance testing of microbial community composition derived from terminal restriction fragment length polymorphisms: application of multivariate statistics. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86(4): 339-347.
- Regensbogenova, M., Pristas, P., Javorsky, P., Moon-van der Staay, S. Y., van der Staay, G. W. M., Hackstein, J. H. P., Newbold, C. J. & McEwan, N. R. (2004). Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE. *Letters in Applied Microbiology*. 39(2): 144-147.
- Richards, D. E., Brown, W. F., Ruegsegger, G. & Bates, D. B. (1994). Replacement value of tree legumes for concentrates in forage-based diets. I. Replacement value of *Gliricidia sepium* for growing goats. *Animal Feed Science and Technology*. 46(1-2): 37-51.
- Rosselló-Mora, R. & Amann, R. I. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*. 25(1): 39-67.

- Rotger, A., Ferret, A., Calsamiglia, S. & Manteca, X. (2006). Effects of nonstructural carbohydrates and protein sources on intake, apparent total tract digestibility, and ruminal metabolism *in vivo* and *in vitro* with high-concentrate beef cattle diets. *Journal of Animal Science*. 84(5): 1188-1196.
- Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 9(5): 313-323.
- Russell, J. B. (1985). Fermentation of celodextrins by cellulolytic and noncellulolytic rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 49(3): 572-576.
- Russell, J. B., Muck, R. E. & Weimer, P. J. (2009). Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. *FEMS Microbiology Ecology*. 67(2): 183-197.
- Rymer, C., Huntington, J. A. & Givens, D. I. (1999). Effects of inoculum preparation method and concentration, method of inoculation and pre-soaking the substrate on the gas production profile of high temperature dried grass. *Animal Feed Science and Technology*. 78(3-4): 199-213.
- Rymer, C., Huntington, J. A., Williams, B. A. & Givens, D. I. (2005). *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124(Part 1): 9-30.
- Santra, A., Kamra, D. N. & Pathak, N. N. (1994). Effect of defaunation on nutrient digestibility and growth of Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. *International Journal of Animal Sciences*. 9: 185-185.
- Sarich, V. M. & Wilson, A. C. (1967). Immunological time scale for hominid evolution. *Science*. 158(3805): 1200-1203.
- Scala, D. J. & Kerkhof, L. J. (2000). Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5): 1980-1986.
- Schmalenberger, A., Schwieger, F. & Tebbe, C. C. (2001). Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(8): 3557-3563.
- Schütte, U. M. E., Abdo, Z., Bent, S. J., Shyu, C., Williams, C. J., Pierson, J. D. & Forney, L. J. (2008). Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80(3): 365-380.
- Schwarz, W. H. (2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56(5): 634-649.
- Seeling, K., Boguhn, J., Strobel, E., Dänicke, S., Valenta, H., Ueberschär, K. H. & Rodehutschord, M. (2006). On the effects of *Fusarium toxin* contaminated wheat and wheat chaff on nutrient utilisation and turnover of deoxynivalenol and zearalenone *in vitro* (Rusitec). *Toxicology in Vitro*. 20(5): 703-711.
- Senshu, T., Nakamura, K., Sawa, A., Miura, H. & Matsumoto, T. (1980). Inoculum for *in vitro* rumen fermentation and composition of volatile fatty acids. *Journal of Dairy Science*. 63(2): 305-312.
- Shannon, C. E. & Weaver, W. (1949). *The Mathematical Theory of Information*. Urbana, IL, EEUU: University of Illinois Press.

- Sharp, R., Ziemer, C. J., Stern, M. D. & Stahl, D. A. (1998). Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiology Ecology*. 26(1): 71-78.
- Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S. & Myers, R. M. (1989). Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86(1): 232-236.
- Shi, P. J., Meng, K., Zhou, Z. G., Wang, Y. R., Diao, Q. Y. & Yao, B. (2008). The host species affects the microbial community in the goat rumen. *Letters in Applied Microbiology*. 46(1): 132-135.
- Shin, E. C., Cho, K. M., Lim, W. J., Hong, S. Y., An, C. L., Kim, E. J., Kim, Y. K., Choi, B. R., An, J. M., Kang, J. M., Kim, H. & Yun, H. D. (2004). Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. *Journal of Applied Microbiology*. 97(2): 378-383.
- Shinkai, T. & Kobayashi, Y. (2007). Localization of ruminal cellulolytic bacteria on plant fibrous materials as determined by fluorescence *in situ* hybridization and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(5): 1646-1652.
- Shinkai, T., Ueki, T. & Kobayashi, Y. (2010). Detection and identification of rumen bacteria constituting a fibrolytic consortium dominated by *Fibrobacter succinogenes*. *Animal Science Journal*. 81(1): 72-79.
- Shyu, C., Soule, T., Bent, S. J., Foster, J. A. & Forney, L. J. (2007). MiCA: A web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes. *Microbial Ecology*. 53(4): 562-570.
- Simpson, J. M., Kocherginskaya, S. A., Aminov, R. I., Skerlos, L. T., Bradley, T. M., Mackie, R. I. & White, B. A. (2002). Comparative microbial diversity in the gastrointestinal tracts of food animal species. *Integrative and Comparative Biology*. 42(2): 327-331.
- Simpson, J. M., McCracken, V. J., White, B. A., Gaskins, H. R. & Mackie, R. I. (1999). Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *Journal of Microbiological Methods*. 36(3): 167-179.
- Singh, B. K., Munro, S., Potts, J. M. & Millard, P. (2007). Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Applied Soil Ecology*. 36(2-3): 147-155.
- Singh, B. K., Nazaries, L., Munro, S., Anderson, I. C. & Campbell, C. D. (2006). Use of multiplex terminal restriction fragment length polymorphism for rapid and simultaneous analysis of different components of the soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(11): 7278-7285.
- Skillman, L. C., Evans, P. N., Naylor, G. E., Morvan, B., Jarvis, G. N. & Joblin, K. N. (2004). 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe*. 10(5): 277-285.
- Slyter, L. L., Nelson, W. O. & Wolin, M. J. (1964). Modifications of a device for maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 12(4): 374-377.
- Slyter, L. L. & Putnam, P. A. (1967). *In vivo* vs. *in vitro* continuous culture of ruminal microbial populations. *Journal of Animal Science*. 26(6): 1421-1427.

- Smith, C. J. & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*. 67(1): 6-20.
- Smith, L. W., Goering, H. K., Waldo, D. R. & Gordon, C. H. (1971). *In vitro* digestion rate of forage cell wall components. *Journal of Dairy Science*. 54(1): 71-76.
- Snel, J., Heinen, P. P., Blok, H. J., Carman, R. J., Duncan, A. J., Allen, P. C. & Collins, M. D. (1995). Comparison of 16S rRNA sequences of segmented filamentous bacteria isolated from mice, rats, and chickens and proposal of "*Candidatus* Arthromitus". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 45(4): 780-782.
- Soder, K. J., Saporito, L. S. & Stout, W. L. (2007). Effect of by-product gypsum application rate to grass pasture, grass hay, and corn silage on fermentation by rumen microorganisms in continuous culture. *Animal Feed Science and Technology*. 132(3-4): 331-340.
- Sokal, R. & Michener, C. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*. 38: 1409-1438.
- Sørensen, T. (1948). A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish Commons. *Biologiske Skrifter*. 5(4): 1-34.
- Spanghero, M., Boccalon, S., Gracco, L. & Gruber, L. (2003). NDF degradability of hays measured *in situ* and *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. 104(1-4): 201-208.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 44(4): 846-849.
- Stahl, D. A., Flesher, B., Mansfield, H. R. & Montgomery, L. (1988). Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(5): 1079-1084.
- Stevenson, D. M. & Weimer, P. J. (2007). Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75(1): 165-174.
- Stewart, C. S., Duncan, S. H. & Richardson, A. J. (1992). The inhibition of fungal cellulolysis by cell free preparation from ruminococci. *FEMS Microbiology Letters*. 97: 83-88.
- Stewart, C. S., Flint, H. J. & Bryant, M. P. (1997). The rumen bacteria. In: *The rumen microbial ecosystem*, 10-72 (Eds P. N. Hobson and C. S. Stewart). Londres, Reino Unido: Chapman and Hall.
- Strobel, E., Seeling, K. & Tebbe, C. C. (2008). Diversity responses of rumen microbial communities to *Fusarium*-contaminated feed, evaluated with rumen simulating technology. *Environmental Microbiology*. 10(2): 483-496.
- Stumm, C. K., Gijzen, H. J. & Vogels, G. D. (1982). Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *British Journal of Nutrition*. 47(01): 95-99.
- Sun, Y. Z., Mao, S. Y. & Zhu, W. Y. (2010). Rumen chemical and bacterial changes during stepwise adaptation to a high-concentrate diet in goats. *Animal*. 4(02): 210-217.

- Sundset, M. A., Edwards, J. E., Cheng, Y. F., Senosiain, R. S., Fraile, M. N., Northwood, K. S., Præsteng, K. E., Glad, T., Mathiesen, S. D. & Wright, A. D. G. (2009). Molecular diversity of the rumen microbiome of Norwegian reindeer on natural summer pasture. *Microbial Ecology*. 57(2): 335-348.
- Sundset, M. A., Præsteng, K. E., Cann, I. K., Mathiesen, S. D. & Mackie, R. I. (2007). Novel rumen bacterial diversity in two geographically separated sub-specie of reindeer. *Microbial Ecology*. 54: 424-438.
- Suzuki, M. T. & Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(2): 625-630.
- Swain, R. A., Nolan, J. V. & Klieve, A. V. (1996). Natural variability and diurnal fluctuations within the bacteriophage population of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(3): 994-997.
- Sylvester, J. T., Karnati, S. K. R., Yu, Z., Morrison, M. & Firkins, J. L. (2004). Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using Real-Time PCR. *The Journal of Nutrition*. 134(12): 3378-3384.
- Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. & Benno, Y. (2001a). Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(6): 2766-2774.
- Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M., Matsui, H. & Benno, Y. (1999). Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology*. 29(2): 159-169.
- Tajima, K., Arai, S., Ogata, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Aminov, R. I. & Benno, Y. (2000). Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe*. 6(5): 273-284.
- Tajima, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. & Aminov, R. I. (2001b). Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. *FEMS Microbiology Letters*. 200(1): 67-72.
- Tamminga, M. K. & Williams, B. A. (1998). *In vitro* techniques as tools to predict nutrient supply in ruminants. In: *In Vitro Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants*, BSAS Occasional Publication N° 22, 1-11 (Eds E. R. Deaville, E. Owen, A. T. Adesogan, C. Rymer, J. A. Huntington and T. L. J. Lawrence). Edimburgo, Reino Unido: BSAS.
- Teather, R. M. & Sauer, F. D. (1988). A naturally compartmented rumen simulation system for the continuous culture of rumen bacteria and protozoa. *Journal of Dairy Science*. 71(3): 666-673.
- Theodorou, M. K., Lowman, R. S., Davies, Z. S., Cuddeford, D. & Owen, E. (1998). Principles of techniques that rely on gas measurements in ruminant nutrition. In: *In Vitro Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants*, BSAS Occasional Publication N° 22, 55-63 (Eds E. R. Deaville, E. Owen, A. T. Adesogan, C. Rymer, J. A. Huntington and T. L. J. Lawrence). Edimburgo, Reino Unido: BSAS.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B. & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 48(3-4): 185-197.

- Thomas, P. C., Roberston, S., Chamberlain, D. G., Livngstone, R. M., Garthwaite, P. H., Dewey, P. J. S., Smart, R. & Whyte, C. (1988). Predicting the metabolizable energy content of compounded feeds for ruminants. In: *Recent Advances in Animal Nutrition*, 127-146 (Eds W. Haresign and D. J. A. Cole). Londres, Reino Unido: Butterworths.
- Tilley, J. M. A. & Terry, R. A. (1963). A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Grass and Forage Science*. 18(2): 104-111.
- Tomás, C. L. (2008). Charla-debate. La crisis mundial de los alimentos: Algunas explicaciones a partir de una mirada situacional desde América Latina, Argentina y Santa Fe.
- Trei, J., Hale, W. H. & Theurer, B. (1970). Effect of grain processing on *in vitro* gas production. *Journal of Animal Science*. 30(5): 825-831.
- Ungerfeld, E. M., Kohn, R. A., Wallace, R. J. & Newbold, C. J. (2007). A meta-analysis of fumarate effects on methane production in ruminal batch cultures. *Journal of Animal Science*. 85(10): 2556-2563.
- Ushida, K., Jouany, J. P. & Demeyer, D. I. (1991). Effects of the presence or absence of rumen protozoa on the efficiency of utilisation of concentrate and fibrous feeds. In: *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*, 595-618 (Eds T. Tsuda, Y. Sasaki and R. Kawashima). San Diego, CA, EEUU: Academic Press.
- Vallaey, T., Topp, E., Muyzer, G., Macheret, V., Laguerre, G., Rigaud, A. & Soulas, G. (1997). Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology*. 24(3): 279-285.
- van der Giezen, M., Rechinger, K. B., Svendsen, I., Durand, R., Hirt, R. P., Fèvre, M., Embley, T. M. & Prins, R. A. (1997). A mitochondrial-like targeting signal on the hydrogenosomal malic enzyme from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: support for the hypothesis that hydrogenosomes are modified mitochondria. *Molecular Microbiology*. 23(1): 11-21.
- van der Gucht, K., Vandekerckhove, T., Vloemans, N., Cousin, S., Muylaert, K., Sabbe, K., Gillis, M., Declerk, S., de Meester, L. & Vyverman, W. (2005). Characterization of bacterial communities in four freshwater lakes differing in nutrient load and food web structure. *FEMS Microbiology Ecology*. 53(2): 205-220.
- van Gelder, A. H., Hetta, M., Rodrigues, M. A. M., De Boever, J. L., Den Hartigh, H., Rymer, C., van Oostrum, M., van Kaathoven, R. & Cone, J. W. (2005). Ranking of *in vitro* fermentability of 20 feedstuffs with an automated gas production technique: Results of a ring test. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124(Part 1): 243-253.
- van Glyswyk, N. (1970). The effect of supplementing a low protein hay on the cellulolytic bacteria in the rumen of sheep and on the digestibility of cellulose and hemicellulose. *Agriculture Science*. 74: 169-180.
- van Soest, P. J. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Ithaca, NY, EEUU: Cornell University Press.
- van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74(10): 3583-3597.

- Vanhoutte, T., De Preter, V., De Brandt, E., Verbeke, K., Swings, J. & Huys, G. (2006). Molecular monitoring of the fecal microbiota of healthy human subjects during administration of lactulose and *Saccharomyces boulardii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(9): 5990-5997.
- Vanhoutte, T., Huys, G., de Brandt, E., Fahey, G. C. & Swings, J. (2005). Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. *FEMS Microbiology Letters*. 249(1): 65-71.
- Vasta, V., Nudda, A., Cannas, A., Lanza, M. & Priolo, A. (2008). Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 147(1-3): 223-246.
- Ventura, M. R., Pieltain, M. C. & Castanon, J. I. R. (2009). Evaluation of tomato crop by-products as feed for goats. *Animal Feed Science and Technology*. 154: 271-275.
- Vérité, R. & Demarquilly, C. (1978). Qualité de matières azotées des aliments pour ruminants. In: *La Vache Laitière*, 143-157. Versailles, Francia: INRA.
- von Wintzingerode, F., Gobel, U. B. & Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*. 21(3): 213-229.
- Wakelin, S. A., Macdonald, L. M., Rogers, S. L., Gregg, A. L., Bolger, T. P. & Baldock, J. A. (2008). Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 40(3): 803-813.
- Wakita, M. & Hoshino, S. (1989). Quantitative observation of starch accumulation and degradation by rumen ciliates genus *Entodinium* *in vitro* and *in vivo*. *Japanese Journal of Zootechnical Science*. 60(1): 1-6.
- Wallace, R. J. (2008). Gut microbiology - broad genetic diversity, yet specific metabolic niches. *Animal*. 2(5): 661-668.
- Warner, A. C. I. (1956). Criteria for establishing the validity of *in vitro* studies with rumen microorganisms in so-called artificial rumen systems. *Journal of General Microbiology*. 14(3): 733-748.
- Warner, A. C. I. (1966a). Diurnal changes in the concentrations of microorganisms in the rumens of sheep fed limited diets once daily. *Journal of General Microbiology*. 45: 213-235.
- Warner, A. C. I. (1966b). Diurnal changes in the concentrations of microorganisms in the rumens of sheep fed to appetite in pens or at pasture. *Journal of General Microbiology*. 45(2): 243-251.
- Warner, A. C. I. (1966c). Periodic changes in the concentrations of microorganisms in the rumen of a sheep fed a limited ration every three hours. *Journal of General Microbiology*. 45(2): 237-241.
- Weatherburn, M. W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*. 39(8): 971-974.
- Weimer, P. J. (1996). Why Don't Ruminant Bacteria Digest Cellulose Faster? *Journal of Dairy Science*. 79(8): 1496-1502.
- Weimer, P. J., Stevenson, D. M., Mantovani, H. C. & Man, S. L. C. (2010). Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. *Journal of Dairy Science*. 93(12): 5902-5912.

- Weimer, P. J., Stevenson, D. M., Mertens, D. R. & Thomas, E. (2008). Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80(1): 135-145.
- Weimer, P. J., Waghorn, G. C., Odt, C. L. & Mertens, D. R. (1999). Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 82(1): 122-134.
- Weiss, W. P. (1994). Estimation of digestibility of forages by laboratory methods. In: *Forage Quality, Evaluation and Utilisation*, 644-681 (Ed G. C. J. Fahey). Madison, WI, EEUU: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America.
- Weiss, W. P., Frobose, D. L. & Koch, M. E. (1997). Wet tomato pomace ensiled with corn plants for dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 80(11): 2896-2900.
- Welkie, D. G., Stevenson, D. M. & Weimer, P. J. (2010). ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe*. 16(2): 94-100.
- Whitehouse, N. L., Olson, V. M., Schwab, C. G., Chesbro, W. R., Cunningham, K. D. & Lykos, T. (1994). Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. *Journal of Animal Science*. 72(5): 1335-1343.
- Whitford, M. F., Forster, R. J., Beard, C. E., Gong, J. & Teather, R. M. (1998). Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe*. 4(3): 153-163.
- Whitford, M. F., McPherson, M. A., Forster, R. J. & Teather, R. M. (2001). Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen *Streptococcus spp.* and isolation and characterization of Bovicin 255. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(2): 569-574.
- Wiener, N. (1948). *Cybernetics or Communication and Control in the Animal and the Machine*. Nueva York, EEUU: John Wiley and Sons.
- Wilkins, J. R. (1974). Pressure transducer method for measuring gas production by microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 27(1): 135-140.
- Williams, A. G. (1986). Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 50(1): 25-49.
- Williams, A. G. & Coleman, G. S. (1997). The rumen protozoa. In: *The rumen microbial ecosystem*, 73-139 (Eds P. N. Hobson and C. S. Stewart). Londres, Reino Unido: Chapman and Hall.
- Williams, A. G. & Strachan, N. H. (1984). Polysaccharide degrading enzymes in microbial populations from the liquid and solid fractions of bovine rumen digesta. *Canadian Journal of Animal Science*. 64, Suppl.: 58-59.
- Williams, A. G., Withers, S. E. & Coleman, G. S. (1984). Glycoside hydrolases of rumen bacteria and protozoa. *Current Microbiology*. 10(5): 287-293.
- Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74(11): 5088-5090.

- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87(12): 4576-4579.
- Wolin, M. J., Miller, T. L. & Stewart, C. S. (1997). Microbe-microbe interactions. In: *The rumen microbial ecosystem*, 467-491 (Eds P. N. Hobson and C. S. Stewart). Londres, Reino Unido: Chapman and Hall.
- Wright, A. D. G. (1999). Analysis of intraspecific sequence variation among eight isolates of the rumen symbiont. *Isotricha prostoma* (Ciliophora), from two continents. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 46: 445-446.
- Wright, A. D. G., Auckland, C. H. & Lynn, D. H. (2007). Molecular diversity of methanogens in feedlot cattle from Ontario and Prince Edward Island, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(13): 4206-4210.
- Wright, A. D. G., Dehority, B. A. & Lynn, D. H. (1997). Phylogeny of the rumen ciliates *Entodinium*, *Epidinium* and *Polyplastron* (Litostomatea: Entodiniomorphida) inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 44(1): 61-67.
- Wright, A. D. G., Williams, A. J., Winder, B., Christophersen, C. T., Rodgers, S. L. & Smith, K. D. (2004). Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(3): 1263-1270.
- Yang, C., Mills, D., Mathee, K., Wang, Y., Jayachandran, K., Sikaroodi, M., Gillevet, P., Entry, J. & Narasimhan, G. (2006). An ecoinformatics tool for microbial community studies: Supervised classification of Amplicon Length Heterogeneity (ALH) profiles of 16S rRNA. *Journal of Microbiological Methods*. 65(1): 49-62.
- 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(10): 2736-2746.
- Yang, W. Z., Beauchemin, K. A. & Vedres, D. D. (2002). Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. *Animal Feed Science and Technology*. 102(1-4): 137-150.
- Yang, W. Z., Beauchemin, K. A., Vedres, D. D., Ghorbani, G. R., Colombatto, D. & Morgavi, D. P. (2004). Effects of direct-fed microbial supplementation on ruminal acidosis, digestibility, and bacterial protein synthesis in continuous culture. *Animal Feed Science and Technology*. 114(1-4): 179-193.
- 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. Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal (Estación Experimental del Zaidín, CSIC) y Universidad de Córdoba.
- Yáñez-Ruiz, D. R., Macías, B., Pinloche, E. & Newbold, C. J. (2010). The persistence of bacterial and methanogenic archaeal communities residing in the rumen of young lambs. *FEMS Microbiology Ecology*. 72(2): 272-278.
- Yáñez-Ruiz, D. R., Martín-García, A. I., Belanche, A., Pinloche, E., Hart, K. J. & Newbold, C. J. (2007). Efecto de la ausencia de protozoos sobre la población microbiana del rumen. In: *I Simposio Avances Metodológicos en Microbiología Digestiva*, 28-30. Zaragoza, España: Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario.

- Yáñez-Ruiz, D. R., Martín-García, A. I., Moumen, A. & Molina-Alcaide, E. (2004a). Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on olive leaves. *Journal of Animal Science*. 82(10): 3006-3014.
- Yáñez-Ruiz, D. R., Moumen, A., Martín-García, A. I. & Molina-Alcaide, E. (2004b). Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: Effect of PEG supply. *Journal of Animal Science*. 82(7): 2023-2032.
- Yáñez-Ruiz, D. R., Scollan, N. D., Merry, R. J. & Newbold, C. J. (2006). Contribution of rumen protozoa to duodenal flow of nitrogen, conjugated linoleic acid and vaccenic acid in steers fed silages differing in their water-soluble carbohydrate content. *British Journal of Nutrition*. 96(05): 861-869.
- Yokoyama, M. T. & Johnson, K. A. (1988). Microbiology of the rumen and intestine. In: *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*, 125-144 (Ed D. C. Church). Nueva Jersey, EEUU: Prentice-Hall.
- Yu, Z. & Morrison, M. (2004). Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(8): 4800-4806.
- Yu, Z., Yu, M. & Morrison, M. (2006). Improved serial analysis of V1 ribosomal sequence tags (SARST-V1) provides a rapid, comprehensive, sequence-based characterization of bacterial diversity and community composition. *Environmental Microbiology*. 8(4): 603-611.
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E. & Guan, L. L. (2009). Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(20): 6524-6533.
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E. & Guan, L. L. (2010). Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(12): 3776-3786.
- Ziemer, C. J., Sharp, R., Stern, M. D., Cotta, M. A., Whitehead, T. R. & Stahl, D. A. (2000). Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S ribosomal RNA-targeted probes. *Environmental Microbiology*. 2(6): 632-643.
- Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. L., Akkermans-van Vliet, W. M., de Visser, J. A. G. M. & de Vos, W. M. (2001). The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 13(3): 129-134.
- Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. L. & De Vos, W. M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(10): 3854-3859.
- Zoetendal, E. G., Collier, C. T., Koike, S., Mackie, R. I. & Gaskins, H. R. (2004). Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *The Journal of Nutrition*. 134(2): 465-472.
- Zuckerkindl, E. & Pauling, L. (1962). Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity. In: *Horizons in Biochemistry*, 189-225 (Eds M. Kasha and B. Pullman). Nueva York, EEUU: Academic Press.

Zuckerkandl, E. & Pauling, L. (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*. 8(2): 357-366.