



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Facultad de Veterinaria

Departamento de Producción Animal

**Estructura de las comunidades microbianas
ruminales de ovejas alimentadas
con diferentes dietas**

*Structure of ruminal microbial communities of
sheep fed different diets*

Cristina Saro Higuera

León, 2012

Memoria presentada por Cristina Saro Higuera y dirigida por las doctoras María José Ranilla García y María Dolores Carro Travieso para optar al grado de Doctora por la Universidad de León, dentro del programa de doctorado “Producción y Sanidad Ovina”.

León, 2012

Los trabajos que componen esta Tesis Doctoral han sido financiados por el CICYT (Proyectos AGL-2004-04755-CO2-01 y AGL-2008-04707-C02-02) y la Junta de Castilla y León (Proyecto GR158).

La autora de esta Tesis Doctoral ha disfrutado de una beca de Formación de Profesorado Universitario (Ministerio de Educación y Ciencia).

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis directoras, María José Ranilla y María Dolores Carro, Mariajo y Loli, por su trabajo, su paciencia y su apoyo.

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

A mis padres

A Iván

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | Página |
|---|--------|
| Índice de contenidos | i |
| Índice de tablas..... | ix |
| Índice de figuras..... | xiii |
| Lista de abreviaciones..... | xv |
| Capítulo 1. Introducción, planteamiento del problema y objetivos | 1 |
| Capítulo 2. Revisión bibliográfica..... | 7 |
| 2.1 El ganado ovino..... | 9 |
| 2.2 El ecosistema ruminal | 11 |
| 2.3 Los microorganismos ruminales | 15 |
| 2.3.1 Bacterias..... | 16 |
| 2.3.2 Arqueas metanogénicas | 18 |
| 2.3.3 Protozoos | 18 |
| 2.3.4 Hongos..... | 20 |
| 2.4 Factores que afectan a la fermentación ruminal y a las poblaciones microbianas | 21 |
| 2.4.1 Alimento | 21 |
| 2.4.2 Composición de la dieta | 22 |
| 2.4.3 Animal hospedador..... | 23 |
| 2.5 Métodos de estudio de las poblaciones microbianas | 24 |
| 2.5.1 Métodos microbiológicos..... | 24 |
| 2.5.2 Métodos basados en ácidos nucleicos | 25 |
| 2.5.2.1 SSCP: Polimorfismo conformacional de la cadena simple. (<i>Single strand conformation polymorphism</i>) | 28 |
| 2.5.2.2 RISA: Análisis de la región espaciadora intergénica ribosomal. (<i>Ribosomal intergenic spacer analysis</i>)..... | 29 |
| 2.5.2.3 RFLP: Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>) | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 2.5.2.4 DGGE: Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante. (<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>) | 30 |
| 2.5.2.5 TGGE: Electroforesis en gel con gradiente de temperatura. (<i>Temperature gradient gel electrophoresis</i>) | 31 |
| 2.5.2.6 Secuenciación..... | 31 |
| 2.5.2.7 PCR competitiva..... | 32 |
| 2.5.2.8 Hibridación con sondas específicas..... | 32 |
| 2.5.2.9 PCR cuantitativa (qPCR)..... | 33 |
| 2.6 Referencias bibliográficas..... | 41 |
| Capítulo 3. Material y métodos | 49 |
| 3.1 Animales y dietas experimentales | 51 |
| 3.2 Procedimientos experimentales y toma de muestras | 52 |
| 3.2.1 Muestras de líquido ruminal | 53 |
| 3.2.2 Muestras de contenido sólido | 54 |
| 3.3 Procesado de las muestras y análisis químicos..... | 54 |
| 3.3.1 Composición química..... | 54 |
| 3.3.2 Parámetros ruminales | 55 |
| 3.3.3 Actividad enzimática | 56 |
| 3.3.4 Recuento de protozoos..... | 57 |
| 3.3.5 Extracción y cuantificación de ADN | 57 |
| 3.3.6 Análisis automatizado de la región espaciadora intergénica ribosomal (<i>Automated ribosomal intergenic spacer analysis, ARISA</i>)..... | 57 |
| 3.3.7 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (<i>Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE</i>)..... | 59 |
| 3.3.8 PCR cuantitativa (<i>Quantitative PCR, qPCR</i>)..... | 60 |
| 3.4 Referencias bibliográficas..... | 64 |
| Capítulo 4. Pruebas experimentales | 67 |
| 4.1 Prueba 1. Diversity of bacterial communities isolated from the solid and liquid phase of the rumen of sheep fed diets of variable composition | 69 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.1 Introduction..... | 75 |
| 4.1.2 Materials and methods | 75 |
| 4.1.3 Results and discussion..... | 77 |
| 4.1.4 Conclusions | 81 |
| 4.1.5 Literature cited | 81 |
| 4.2 Prueba 2. Postprandial evolution of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets varying in type of forage as monitored by real-time PCR and ARISA..... | 83 |
| 4.2.1 Introduction..... | 88 |
| 4.2.2 Material and methods | 89 |
| 4.2.2.1 Animals and diets | 89 |
| 4.2.2.2 Experimental procedure and sampling..... | 90 |
| 4.2.2.3 DNA extraction and analysis of microbial communities by quantitative PCR..... | 91 |
| 4.2.2.4 Analysis of bacterial communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA)..... | 93 |
| 4.2.2.5 Chemical analysis..... | 94 |
| 4.2.2.6 Calculations and statistical analyses..... | 95 |
| 4.2.3 Results and discussion..... | 95 |
| 4.2.3.1 qPCR analisis of microbial communities | 96 |
| 4.2.3.2 Enzymatic activity..... | 99 |
| 4.2.3.4 Bacterial community composition assessed by automated ribosomal intergenic spacer analysis..... | 103 |
| 4.2.4 Literature cited | 108 |
| 4.3 Prueba 3. Influence of forage type on ruminal microbes and bacterial diversity in sheep | 113 |
| 4.3.1 Introduction..... | 118 |
| 4.3.2 Materials and methods | 119 |
| 4.3.2.1 Animals and diets | 119 |
| 4.3.2.2 Experimental procedure and sampling..... | 120 |

| | |
|--|-----|
| 4.3.2.3 DNA extraction and analysis of microbial communities by quantitative PCR (qPCR) | 121 |
| 4.3.2.4 Analysis of bacterial communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA)..... | 123 |
| 4.3.2.5 Chemical analysis | 124 |
| 4.3.2.6 Calculations and statistical analyses | 125 |
| 4.3.3 Results | 126 |
| 4.3.3.1 Ruminal fermentation | 126 |
| 4.3.3.2 Microbial populations | 126 |
| 4.3.3.3 Bacterial diversity | 133 |
| 4.3.4 Discussion | 137 |
| 4.3.4.1 Ruminal fermentation | 137 |
| 4.3.4.2 Microbial populations | 138 |
| 4.3.4.3 Bacterial diversity | 141 |
| 4.3.5 Conclusion | 142 |
| 4.3.6 References | 143 |
| 4.4 Prueba 4. Comparison of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize bacterial diversity in the rumen of sheep fed two different forages..... | 147 |
| 4.4.1 Introduction | 152 |
| 4.4.2 Materials and methods..... | 153 |
| 4.4.2.1 Diets, animals, experimental design, and sample collection | 153 |
| 4.4.2.2 DNA extraction..... | 154 |
| 4.4.2.3 Analysis of bacterial communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis | 155 |
| 4.4.2.4 Analysis of bacterial communities by denaturing gradient gel electrophoresis | 155 |
| 4.4.2.5 Statistical analyses..... | 156 |
| 4.4.3 Results and discussion | 158 |

| | |
|---|------------|
| 4.4.4 Referencias..... | 167 |
| 4.5 Prueba 5. Distribución de la población bacteriana y la actividad enzimática fibrolítica en las fases líquida y sólida de la digesta del rumen de ovejas alimentadas con dos dietas forrajeras | 171 |
| 4.5.1 Introducción | 176 |
| 4.5.2 Material y métodos | 176 |
| 4.5.3 Resultados y discusión..... | 179 |
| 4.5.3.1 Contenido en materia seca de la digesta ruminal | 179 |
| 4.5.3.2 Actividades enzimáticas en el contenido ruminal | 179 |
| 4.5.3.3 Concentración bacteriana en el contenido ruminal..... | 182 |
| 4.5.4 Referencias bibliográficas | 184 |
| Capítulo 5. Discusión general | 187 |
| Capítulo 6. Conclusiones / <i>Conclusions</i> | 207 |
| Capítulo 7. Resumen /<i>Summary</i> | 213 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|---|--------|
| Tabla 2.1 Censo mundial de ganado ovino | 9 |
| Tabla 2.2 Censo nacional de ganado ovino | 10 |
| Tabla 2.3 Relación de trabajos dónde se utilizaron técnicas moleculares para el estudio del ecosistema ruminal, la técnica empleada y la especie en que se realizó el estudio | 37 |
| Tabla 3.1 Composición química de las dietas experimentales con una relación forraje concentrado 70:30 (HF) o 30:70 (HG) y heno de alfalfa (A) o heno de gramíneas (G) como forraje | 52 |
| Tabla 3.2 Secuencias de los cebadores para el análisis automatizado de la región espaciadora intergénica ribosomal | 58 |
| Tabla 3.3 Secuencias de los cebadores para la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante..... | 59 |
| Tabla 3.4 Secuencias de los cebadores para la PCR cuantitativa | 60 |
| Table 4.1.1 Values of Shannon index and numbers of peaks detected in the ARISA electropherograms of liquid-associated (LAB) and solid-associated (SAB) bacterial pellets isolated from the rumen of sheep receiving diets differing in forage:concentrate ratio (F:C) and type of forage (FOR), and similarity index (%) of ARISA profiles between LAB and SAB pellets | 78 |
| Table 4.2.1 Chemical composition of the experimental diets containing 70% of alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as forage and 30% of concentrate (DM basis)..... | 89 |
| Table 4.2.2 Oligonucleotide probes used in this study for quantitative PCR analysis | 92 |
| Table 4.2.3 Postprandial changes of total bacterial DNA, total protozoal DNA, and the relative abundance of <i>Fibrobacter succinogenes</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , and fungal DNA in solid ruminal contents from sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR (n=4)..... | 97 |

| | |
|---|-----|
| Table 4.2.4 Postprandial changes of ruminal fluid pH and enzymatic activities in ruminal solid digesta from sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR (n=4) | 101 |
| Table 4.2.5 Correlation matrix (values of Pearson coefficient; P values in brackets) between ruminal pH, microbial measurements (total bacterial DNA (BAC), total protozoal DNA (PROT), the relative abundance of <i>Fibrobacter succinogenes</i> (FS), <i>Ruminococcus flavefaciens</i> (RF), <i>Ruminococcus albus</i> (RA) and fungal DNA (FUN)) and enzymatic activities (carboxymethylcellulase (CMCase), Avicelase (AV), xylanase (XYL) and amylase (AM)) in the rumen of sheep fed 70:30 forage:concentrate diets with alfalfa hay or grass hay as forage (n=24)..... | 102 |
| Table 4.2.6 Postprandial changes of values of number of peaks and Shannon index in the ARISA electropherograms of solid ruminal contents from sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR and similarity index of ARISA profiles between AL and GR samples from the same sheep (n=4) | 104 |
| Table 4.3.1 Chemical composition of the experimental diets containing 70% of alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as forage and 30% of concentrate (dry matter basis)..... | 119 |
| Table 4.3.2: Oligonucleotide primers used in this study for quantitative PCR analysis. | 122 |
| Table 4.3.3 Postprandial changes of fermentation parameters and enzymatic activities in the ruminal fluid of sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR (n=4)..... | 127 |
| Table 4.3.4 Postprandial changes of protozoa numbers determined by microscopic counting in ruminal fluid from sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR (n=4) | 129 |
| Table 4.3.5 Postprandial changes of, concentrations of total bacterial DNA, total protozoal DNA, and the relative abundance of <i>Ruminococcus flavefaciens</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Fibrobacter</i> | |

succinogenes, fungal and methanogenic archaeal DNA in ruminal fluid from sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR (n=4)130

- Table 4.3.6** Correlation matrix (values of Pearson coefficient; P values in brackets) between microbial measurements (total bacterial DNA (TB) and total protozoal DNA (TPR), relative abundance of *Fibrobacter succinogenes* (FS), *Ruminococcus flavefaciens* (RF), *Ruminococcus albus* (RA), fungal DNA (FUN) and methanogenic archaea DNA (MAR) and numbers of total protozoa (PRN) and Entodiniinae (ENN)) and fermentation parameters (pH, concentrations of lactate (LAC), NH₃-N (AMO) and total VFA (VFA), molar proportions of acetate (AC), propionate (PR), butyrate (BT), and other VFA (OVFA, calculated as the sum of isobutyrate, isovalerate, valerate and caproate), acetate:propionate ratio (Ac/Pr) and enzymatic activities (carboxymethylcellulase (CMCase), xylanase (XYL) and amylase (AM)) in ruminal fluid of sheep fed 70:30 forage:concentrate diets with alfalfa hay or grass hay as forage (n=24)132
- Table 4.3.7** Postprandial changes of mean values of Shannon index and numbers of peaks detected in the ARISA electropherograms of ruminal fluid from sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR and similarity index of ARISA profiles between AL and GR samples from the same sheep (n=4).....134
- Table 4.4.1** Postprandial evolution of values of number of peaks and bands and Shannon index in solid ruminal digesta from sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR assessed either by ARISA or DGGE and similarity index of profiles between AL and GR samples from the same sheep (n=4)157
- Table 4.4.2** Postprandial evolution of values of number of peaks and bands and Shannon index in ruminal fluid from sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR assessed either by ARISA or DGGE and similarity index profiles between AL and GR samples from the same sheep (n=4)159

| | |
|--|-----|
| Table 4.4.3 P-values of the Student's- t test comparing the number of peaks/bands and Shannon index values in ruminal solid digesta with those in ruminal fluid from sheep fed 70:30 forage:concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as forage and assessed either by ARISA or DGGE..... | 163 |
| Tabla 4.5.1 Efecto del tipo de forraje (FOR) y tiempo de muestreo tras la administración de alimento (T) en el contenido en materia seca (MS) de la digesta ruminal de ovejas alimentadas con dietas con relación forraje:concentrado 70:30 y heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) como forraje | 179 |
| Tabla 4.5.2 Efecto del tipo de forraje (FOR) y tiempo de muestreo (T) en las actividades enzimáticas (AE) del contenido ruminal de ovejas alimentadas con dietas con relación forraje:concentrado 70:30 y heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) como forraje | 180 |
| Tabla 4.5.3 Efecto del tipo de forraje (FOR) y tiempo de muestreo tras la administración de alimento (T) en la cantidad de ADN bacteriano (ADNb) del contenido ruminal de ovejas alimentadas con dietas con relación forraje:concentrado 70:30 y heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) como forraje | 183 |
| Tabla 5.1 Efecto del tipo de forraje (FOR) y el tiempo de muestreo (T) en las concentraciones totales de ADN bacteriano y protozoario en las fases sólida y líquida de la digesta del rumen de ovejas alimentadas con una dieta con una relación forraje:concentrado 70:30 y con heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) como forraje | 202 |
| Tabla 5.2 Efecto del tipo de forraje (FOR) y el tiempo de muestreo (T) en las abundancias relativas de <i>Fibrobacter succinogenes</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> y <i>Ruminococcus albus</i> en las fases sólida y líquida de la digesta del rumen de ovejas alimentadas con una dieta con una relación forraje:concentrado 70:30 y con heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) como forraje | 203 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 2.1 Bacterias ruminales observadas al microscopio electrónico..... | 15 |
| Figura 2.2 Curva de amplificación en la qPCR..... | 35 |
| Figura 3.1 Proceso de obtención de los pellet de LAB y SAB..... | 62 |
| Figura 3.2 Proceso de obtención del pellet de protozoos..... | 63 |
| Figure 4.1.1 Principal component analysis generated from ARISA profiles of liquid-associated (A) and solid-associated (B) bacteria isolated from sheep fed diets containing alfalfa hay (Δ) or grass hay (▲). Sheep received diets with F:C ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay or grass hay as forage. Numbers 1 to 4 correspond to individual sheep..... | 80 |
| Figure 4.2.1 Dendrogram of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) profiles of bacteria in the solid ruminal digesta from sheep fed diets containing 30% concentrate and 70% alfalfa hay (AL) or grass hay (GR). Numbers 1 to 4 correspond to individual sheep. Samples were taken at 0, 4 and 8 h post-feeding..... | 106 |
| Figure 4.2.2 Principal component analysis generated from automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) profiles of solid ruminal digesta from sheep fed diets containing 30% concentrate and 70% alfalfa hay (AL; shaded symbols) or grass hay (GR; open symbols). Samples were taken at 0 (A), 4 (B) and 8 (C) h post-feeding. Numbers 1 to 4 correspond to individual sheep..... | 107 |
| Figure 4.3.1 Dendrogram of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) profiles of ruminal fluid from sheep fed diets containing 30% concentrate and 70% alfalfa hay (AL) or grass hay (GR). Numbers 1 to 4 correspond to individual sheep. Samples were taken at 0, 4 and 8 h post-feeding..... | 135 |
| Figure 4.3.2 Principal component analysis generated from automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) profiles of ruminal fluid from sheep fed diets containing | |

| | |
|--|-----|
| 30% concentrate and 70% alfalfa hay (AL; shaded symbols) or grass hay (GR; open symbols). Samples were taken at 0 (A), 4 (B) and 8 (C) h post-feeding. Numbers 1 to 4 correspond to individual sheep | 136 |
| Figure 4.4.1 Dendrograms of ARISA and DGGE profiles of solid (S) and liquid (L) ruminal digesta from sheep fed diets containing 30% concentrate and 70% of either alfalfa hay (AL) or grass hay (GR). Samples were taken at 0, 4 and 8 h post-feeding. Dendrograms correspond to samples taken from an individual sheep (sheep 1 and 2) | 165 |
| Figure 4.4.2 Dendrograms of ARISA and DGGE profiles of solid (S) and liquid (L) ruminal digesta from sheep fed diets containing 30% concentrate and 70% of either alfalfa hay (AL) or grass hay (GR). Samples were taken at 0, 4 and 8 h post-feeding. Dendrograms correspond to samples taken from an individual sheep (sheep 3 and 4) | 166 |
| Figura 4.5.1 Evolución posprandial del pH del líquido ruminal de ovejas alimentadas con dietas con relación forraje:concentrado 70:30 y heno de gramíneas (GR) o heno de alfalfa (AL) como forraje | 181 |

LISTA DE ABREVIACIONES

| | |
|--|---|
| A/AL | dieta cuyo forraje es heno de alfalfa |
| A₂₆₀/A₂₈₀ | relación de absorbancias a 260 y 280 nanómetros |
| ADN/DNA | ácido desoxirribonucleico |
| AGV/VFA | ácidos grasos volátiles |
| ARISA | <i>automated ribosomal intergenic spacer analysis</i> |
| ARN | ácido ribonucleico |
| °C | grado centígrado |
| cm | centímetro |
| C_q | ciclo de cuantificación |
| CTAB | bromuro de cetiltrimetilamonio |
| DAPA | ácido diaminopimélico |
| DGGE | <i>denaturing gradient gel electrophoresis</i> |
| DTT | ditiotreitól |
| EDTA | ácido etilendiaminotetraacético |
| F:C | relación forraje:concentrado |
| FAD/ADF | fibra ácido detergente |
| FAD⁺ | flavín adenín dinucleótido |
| FISH | <i>fluorescence in situ hybridization</i> |
| FND/NDF | fibra neutro detergente |
| FOR | forraje |
| g | gramo |
| g | fuerza de la gravedad |
| h | hora |
| HF | dieta cuya relación forraje:concentrado es 70:30 |
| HC | dieta cuya relación forraje:concentrado es 30:70 |
| LAB | bacterias asociadas a la fase líquida |
| M | molar |

| | |
|------------------------|--|
| MF/FM | materia fresca |
| min | minuto |
| μL | microlitro |
| mL | mililitro |
| μm | micrómetro |
| μM | micromolar |
| mm | milímetro |
| mM | milimolar |
| MO | materia orgánica |
| MS/DM | materia seca |
| NAD⁺ | nicotinamida adenín dinucleótido |
| ng | nanogramo |
| nm | nanómetro |
| PCA | <i>principal component analysis</i> |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| qPCR | PCR cuantitativa |
| RISA | <i>ribosomal intergenic spacer analysis</i> |
| rpm | revoluciones por minuto |
| SAB | bacterias asociadas a la fase sólida |
| T-RFLP | <i>terminal restriction fragment length polymorphism</i> |
| UI | unidades internacionales |
| UPGMA | <i>unweight pair-group method algorithm</i> |
| vol:vol/v:v | volumen:volumen |

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN, PLANTEAMIENTO DEL

PROBLEMA Y OBJETIVOS

La población de ovino en España asciende a casi 20 millones de cabezas, lo que indica la importancia económica y productiva que tiene esta especie en nuestro país. España ocupa el segundo lugar de la Unión Europea en efectivos de ovino tras el Reino Unido (21,2 millones de cabezas) y ocupa también el segundo lugar en lo que se refiere a la cantidad de producto obtenido. La distribución geográfica de la cabaña ovina en España no es homogénea, pero la comunidad autónoma de Castilla y León es la segunda en número de efectivos, con casi el 20% de la cabaña de ovino nacional. Tradicionalmente, la mayoría de los sistemas de explotación del ganado ovino han sido de tipo extensivo o semiextensivo, pero en los últimos años se han incrementado las explotaciones que han evolucionado hacia lo que podría denominarse “sistemas intensivos”, por lo que en la actualidad los sistemas de explotación son muy variados. Esta gran variabilidad se refleja también en la alimentación de las ovejas, que en muchos casos se basa en el aprovechamiento de recursos forrajeros propios (pastos, rastrojeras, subproductos, etc.), y se completa con otros que en numerosas ocasiones son adquiridos fuera de la explotación (pulpa de remolacha, soja, cereales, etc.).

Como todos los rumiantes, las ovejas poseen la capacidad de digerir y fermentar los componentes fibrosos de los vegetales. Esta capacidad se debe a la simbiosis que se establece entre el animal hospedador y los microorganismos que forman parte del complejo ecosistema que alberga el rumen. La cuantificación de los procesos que transcurren en el rumen constituye un punto clave para la valoración nutritiva de los alimentos y la elaboración de dietas equilibradas para los animales rumiantes. Adicionalmente, estos procesos repercuten en la calidad de los productos obtenidos (leche y carne), en el bienestar y salud de los animales, y en la contaminación medioambiental, ya que algunos de los productos finales de la fermentación ruminal (p. ej. metano) presentan un elevado potencial contaminante. Por ello, el conocimiento de los procesos que transcurren en el rumen tiene una gran importancia.

A pesar del elevado número de estudios realizados sobre el ecosistema ruminal, el conocimiento de las comunidades microbianas ruminales es todavía escaso. Ello se debe a las limitaciones que presentan las

técnicas de cultivo anaeróbicas, las cuales impiden el cultivo de determinados microorganismos y dan una imagen incompleta de las especies presentes en el rumen. Las técnicas moleculares disponibles en la actualidad se presentan como una herramienta de extraordinario interés, ya que pueden contribuir a una mejor caracterización de la microbiota ruminal y de su dinámica en función de diversos factores, entre los que destaca, por su importancia, el tipo de dieta. En los últimos años se han comenzado a aplicar técnicas moleculares al estudio de la diversidad de la población microbiana ruminal. Algunas de las técnicas utilizadas hasta el momento, como la DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*), el T-RFLP (*terminal-restriction fragment length polymorphism*) y el ARISA (*automated ribosomal intergenic spacer analysis*) posibilitan el estudio de la biodiversidad de los grupos microbianos del rumen (hongos, protozoos, bacterias y arqueas), profundizando así en el conocimiento de los mismos. Adicionalmente, la utilización de la PCR en tiempo real permite cuantificar algunos grupos microbianos concretos.

Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento se han llevado a cabo en el ganado vacuno y son muy escasos los realizados en ovino. Adicionalmente, los pocos estudios realizados en ovino que han analizado la influencia de factores dietéticos sobre las poblaciones ruminales se han centrado en la relación forraje:concentrado en la dieta. Por el contrario, no existen estudios en los que se analicen los efectos del tipo de forraje en la dieta sobre estas poblaciones microbianas, a pesar de la importancia que tienen los forrajes en la alimentación del ganado ovino en sistemas extensivos y semiextensivos.

Con estos antecedentes, en esta Tesis Doctoral se pretende caracterizar la microbiota ruminal de ovejas alimentadas con dietas representativas de las que se utilizan en condiciones prácticas de alimentación, utilizando para ello técnicas moleculares que permiten superar las limitaciones de las técnicas clásicas de cultivo de microorganismos. Para lograr este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1) Analizar el efecto de la dieta que reciben las ovejas sobre la diversidad bacteriana en las fases sólida y líquida del rumen.

2) Investigar la evolución posprandial de las poblaciones microbianas (bacterias, protozoos, hongos y arqueas) en el rumen de ovejas alimentadas con dietas forrajeras.

3) Comparar dos métodos (ARISA y DGGE) para el análisis de la diversidad bacteriana en el rumen de ovejas.

4) Analizar la distribución de la población bacteriana en las fases líquida y sólida de la digesta ruminal de ovejas alimentadas con dietas forrajeras.

CAPÍTULO 2
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El ganado ovino

La oveja fue, junto con la cabra, la primera especie ganadera domesticada por el hombre hace 13 000 años. Fueron introducidas en la Península Ibérica hace 7000 años por dos vías: a través de los Pirineos, procedentes de Francia, y a través de las islas del Mediterráneo. Desde entonces, los diferentes pueblos que habitaron la Península aportaron conocimientos a las arcaicas agricultura y ganadería de entonces (cabe citar la extensión del cultivo de cereales por los romanos y la extensión de la ganadería ovina impulsada por musulmanes y romanos). Donde el ganado ovino alcanza mayor protagonismo es en los reinos de Castilla y de León a partir de la segunda mitad del siglo XII con la aparición de la gran trashumancia para aprovechamiento en pastoreo de las grandes extensiones de terreno del sur de la Península y que da lugar a la organización de los ganaderos creándose, en 1273, el Honrado Concejo de la Mesta de Pastores por Alfonso X de Castilla. Esta organización corporativa, considerada el primer gremio ganadero, duró hasta bien entrado el siglo XIX cuando se convirtió en la Asociación General de Ganaderos del Reino. Por aquel entonces el censo ovino se situaba en torno a 22,5 millones de cabezas y aumentó hasta 24 millones en los años 40 del siglo pasado.

Tabla 2.1: Censo mundial de ganado ovino (FAO STAT, 2010)

| | Total | Porcentaje |
|--------------|----------------------|-------------------|
| Asia | 453 843 099 | 42,06 |
| África | 300 448 070 | 27,85 |
| Europa | 130 710 094 | 12,11 |
| Oceanía | 100 664 040 | 9,33 |
| América | 93 282 898 | 8,65 |
| Mundo | 1 078 948 201 | 100 |

En la actualidad el censo mundial de cabezas de ganado ovino asciende a mil millones, de las cuales cerca de la mitad se localizan en Asia. La distribución por continentes se muestra en la Tabla 2.1. En la Unión Europea se sitúa el 10% de la población mundial. En España la cantidad de cabezas representa casi el 20% del censo de la Unión Europea y la distribución por comunidades autónomas se refleja en la Tabla 2.2. Del

mismo modo, la producción de leche en España representa el 17% de la producida en la Unión Europea.

La comunidad autónoma de Castilla y León es la segunda de España con mayor número de cabezas de ovino tras Extremadura; sin embargo, en la misma se produce el 60% de la leche de oveja de España. En la provincia de León el ovino es la especie ganadera más abundante con 550 000 cabezas y es, tras Zamora, la segunda provincia en censo ovino de la comunidad.

Tabla 2.2: Censo nacional de ganado ovino (MAGRAMA, 2011)

| | Total | Porcentaje |
|------------------------|-------------------|-------------------|
| Extremadura | 3 511 750 | 20,65 |
| Castilla y León | 3 278 618 | 19,28 |
| Castilla-La Mancha | 2 659 177 | 15,64 |
| Andalucía | 2 212 590 | 13,01 |
| Aragón | 2 004 561 | 11,79 |
| Cataluña | 607 887 | 3,58 |
| Navarra | 526 400 | 3,31 |
| Región de Murcia | 525 375 | 3,09 |
| Comunidad Valenciana | 360 716 | 2,12 |
| Islas Baleares | 328 965 | 1,93 |
| País Vasco | 308 129 | 1,81 |
| Galicia | 205 182 | 1,21 |
| La Rioja | 121 953 | 0,72 |
| Comunidad de Madrid | 101 307 | 0,60 |
| Islas Canarias | 91 321 | 0,54 |
| Cantabria | 61 422 | 0,36 |
| Principado de Asturias | 61 368 | 0,36 |
| España | 17 002 721 | 100 |

2.2 El ecosistema ruminal

Los animales rumiantes poseen la capacidad de alimentarse de productos vegetales que contienen carbohidratos fibrosos como la celulosa y que resultan indigestibles para el resto de los mamíferos. Esta característica está asociada a las diferencias anatómicas y funcionales del aparato digestivo de estos. Los animales rumiantes son también denominados poligástricos, ya que su estómago se encuentra dividido en compartimentos diferenciados funcionalmente. Los tres primeros (rumen, retículo y omaso) son conocidos como preestómagos ya que se sitúan por delante del verdadero estómago glandular o abomaso. En el rumen y el retículo se establece una compleja población microbiana capaz de degradar los hidratos de carbono estructurales que llegan allí (Cheng *et al.*, 1991). Así, los rumiantes se alimentan de los productos finales de la fermentación, por parte de los microorganismos, del alimento ingerido y de los nutrientes que forman parte de dichos microorganismos cuando estos son digeridos en el abomaso e intestino delgado (Asplund, 1994).

El rumen es el mayor de los preestómagos y su interior se encuentra dividido en compartimentos denominados sacos, separados entre sí mediante pilares musculares (Van Soest, 1994). La mucosa que recubre el interior del rumen, al igual que la del retículo y omaso está constituida por tejido epitelial no glandular y forma papilas filiformes de tamaño variable que suponen un aumento de la superficie de absorción del rumen. El retículo se sitúa cranealmente al rumen y en muchas ocasiones se consideran una única cavidad ya que la separación está delimitada por el pliegue retículo ruminal que permite el libre paso de partículas entre ambos. Sin embargo la mucosa que recubre el retículo forma celdas hexagonales, difiriendo de la superficie ruminal. Ambas tienen como función la absorción de nutrientes (Van Soest, 1994). El omaso se localiza anatómicamente a la derecha del rumen y se comunica con el conjunto retículo-rumen a través del orificio retículo-omasal y con el abomaso por el orificio abomaso-omasal. Su mucosa presenta papilas en forma de hoja que absorben agua y minerales y cuya principal función es evitar el paso de partículas de gran tamaño del retículo al abomaso (Van Soest, 1994). Por último, el abomaso está situado en el costado derecho del rumiante y presenta pliegues aumentando así su superficie. Su mucosa es de tipo glandular y secreta mucus, pepsinógeno y ácido clorhídrico, de forma similar al estómago de los animales monogástricos (Van Soest, 1994).

Al nacimiento, el rumiante presenta un retículo-rumen muy pequeño y no funcional, ya que no posee microorganismos suficientes para llevar a cabo procesos fermentativos. Tras el nacimiento el animal se inocular con los microorganismos que pueblan el ambiente, entre ellos los ruminales. Además, al nacimiento tampoco es funcional el abomaso, favoreciéndose la absorción de las gamma-globulinas presentes en el calostro. Existe además una comunicación directa para que al mamar la leche pase directamente al omaso y abomaso llamada gotera esofágica y cuyo cierre se estimula por receptores en la faringe y en respuesta a la succión de la mama. El rumen se va desarrollando conforme el animal comienza a consumir alimentos fibrosos, produciéndose ácidos grasos volátiles que favorecen el desarrollo de las papilas ruminales y se seleccionan en el rumen los microorganismos especializados en la fermentación ruminal. A la vez se desarrolla la musculatura retículo-ruminal y desaparece el reflejo de cierre de la gotera esofágica.

El contenido ruminal no se encuentra formando una mezcla homogénea, si no que está estratificado en función de la densidad de sus componentes (Cheng y McAllister, 1997). En la parte superior del rumen se acumulan los gases producidos durante la fermentación. El material sólido o semisólido se sitúa en la parte central del rumen formando un entramado y en la parte inferior se encuentra el líquido, con pequeñas partículas en suspensión. El movimiento del contenido ruminal entre los diferentes sacos del rumen se debe a las contracciones ruminales (Van Soest, 1994). Estas contracciones hacen que el contenido líquido ruminal circule a través del sólido, arrastrando de esta forma partículas solubles y microorganismos hacia tramos posteriores del tracto gastrointestinal. Además, las contracciones secundarias favorecen los procesos de rumia y eructación. La rumia consiste en la regurgitación de parte del contenido ruminal hacia la boca, donde se vuelve a masticar e insalivar antes de ser deglutido (Van Soest, 1994). La rumia es un proceso cíclico y el tiempo que los animales dedican a rumiar es directamente proporcional a la cantidad de fibra en la dieta ingerida, existiendo además factores que pueden llegar a inhibirla. Mediante el eructo los rumiantes eliminan el gas producido en el rumen durante los procesos fermentativos, principalmente dióxido de carbono y metano. Este proceso se produce por la contracción del saco dorsal del rumen a la vez que se relaja el cardias.

La actividad del rumen está regulada por el sistema nervioso parasimpático y responde al estímulo de diversos receptores. Los

mecanorreceptores bucales se estimulan cuando el animal está masticando, tanto durante la alimentación como durante la rumia y provocan, de forma refleja, un aumento de la frecuencia de las contracciones ruminales. Existen además receptores de presión que miden el grado de distensión de la capa muscular del rumen, abomaso e intestino y que favorecen la motilidad cuando detectan distensión en las paredes ruminales (siempre y cuando esta no sea excesiva en cuyo caso se inhiben generando procesos patológicos). Los alimentos forrajeros, más voluminosos, favorecen la motilidad ruminal y los procesos fermentativos más que los alimentos concentrados, ya que distienden más las paredes ruminales. También existen en el rumen receptores de tipo químico que detectan cambios en el pH, la concentración de ácidos grasos volátiles y la osmolaridad. Cuando el pH se reduce por aumento de la concentración de ácidos en el rumen se inhiben la motilidad y los procesos fermentativos.

El rumen proporciona a los microorganismos un ambiente idóneo para su desarrollo:

-Se encuentra a una temperatura constante (39°C), regulada por el sistema homeotermo del rumiante hospedador. Las fermentaciones que ocurren en su interior son procesos exotérmicos, disipándose en el rumen entre un 4% y un 12% en forma de calor (Blaxter, 1967), de manera que si estuviera aislado podría alcanzar los 50°C en un día (Czerkawski, 1986). El rumiante mantiene su temperatura corporal. Gracias a la irrigación de las paredes del rumen, el calor se dirige por la sangre hacia la piel, que actúa como refrigerador. Además, el peristaltismo ruminal evita el sobrecalentamiento de las paredes.

-El pH se mantiene relativamente constante (6-7). El rumen es un sistema anaerobio en el que se producen fermentaciones de azúcares cuyo producto final son ácidos grasos volátiles y otros ácidos orgánicos que al liberarse al medio hacen disminuir el pH (Czerkawski, 1986). El mantenimiento del pH en valores próximos a la neutralidad es posible por la absorción de ácidos grasos volátiles a través de la pared del rumen y por el efecto tampón que ejerce la saliva del rumiante, que posee gran cantidad de fosfatos y bicarbonatos. Una oveja produce entre 10 y 15 litros de saliva diarios (Czerkawski, 1986).

-El potencial redox se mantiene estable (de -250 a -450 mv). En el rumen, pese a ser un ecosistema anaerobio, entran pequeñas cantidades de oxígeno, con el alimento y el agua de bebida, durante la rumia, en la que se

expone el bolo ruminal al oxígeno atmosférico y mediante difusión del oxígeno plasmático a través de las paredes del rumen. Los niveles de anaerobiosis se mantienen por la absorción del oxígeno también a través de las paredes y por el uso de este como aceptor de electrones por las bacterias anaerobias facultativas de la flora epimural (Czerkawski y Breckenridge, 1978).

-Los productos no digeridos, así como los productos finales de fermentación y los desechos son eliminados ya que para que el rumen funcione correctamente no deben acumularse en exceso. Los gases producidos (dióxido de carbono y metano principalmente, y también pequeñas cantidades de nitrógeno, ácido sulfhídrico, hidrógeno y oxígeno) forman pequeñas burbujas que se van uniendo y aumentando de tamaño hasta que son eliminadas a través del orificio retículo-ruminal y el cardias gracias a las contracciones ruminales. Los ácidos grasos volátiles se absorben directamente por la pared del rumen o pasan a partes posteriores del tracto gastrointestinal (mediante esta última vía se eliminan entre un 10% y un 20% (Weston y Hogan, 1968)). El ritmo de salida está determinado por la tasa de renovación del líquido en el rumen, el cual depende del volumen de agua ingerida, de la saliva producida y de la difusión de agua desde el plasma sanguíneo. El hidrógeno es utilizado por las arqueas metanogénicas junto con el dióxido de carbono para producir metano.

-La presión osmótica está por debajo de niveles isotónicos para permitir el flujo de líquidos desde el rumen hacia el torrente sanguíneo. La absorción de ácidos grasos volátiles a través de las paredes del rumen favorece el mantenimiento de la presión osmótica en valores adecuados, lo cual es crucial para permitir la reabsorción de sodio, cloro, fosfatos y otros iones que se encuentran en la saliva y que permiten mantener el equilibrio hídrico, ácido-básico y electrolítico en el animal hospedador (Dobson, 1959). Esta reabsorción está favorecida también por la rumia e insalivación, las cuales promueven la renovación del líquido en el rumen y el lavado de las partículas más finas.

2.3 Los microorganismos ruminales

Los microorganismos que pueblan el tracto gastrointestinal de los herbívoros son los principales responsables de la digestión de los carbohidratos complejos que contiene el alimento. Las poblaciones de microorganismos en el rumen, gracias a sus capacidades fisicoquímicas, transforman el alimento mediante un proceso de fermentación anaerobia en otros productos. El animal hospedador aprovecha algunos de los productos finales de la fermentación absorbiéndolos a través de la mucosa del rumen y el retículo (Asplund, 1994). Además de esto, el rumiante utiliza la proteína no degradada en el rumen por los microorganismos y la contenida en los mismos, cuando llegan a tramos posteriores del tracto gastrointestinal, para cubrir sus necesidades.

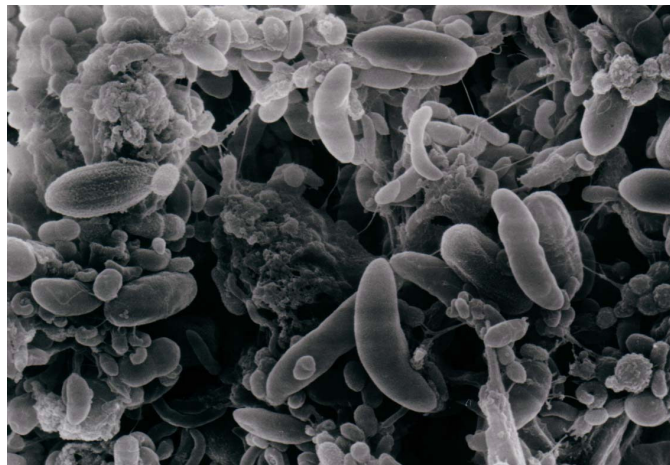


Figura 2.1: Bacterias ruminales observadas al microscopio electrónico

El ecosistema ruminal está compuesto por bacterias (más de 200 especies, con una concentración media de 10^{10} bacterias/mL), arqueas metanogénicas, protozoos (más de 20 especies, con cifras de 10^6 protozoos/mL) y hongos (con densidades que alcanzan las 10^4 zoosporas/mL) (Mackie *et al.*, 2002). Entre los microorganismos del rumen se establecen relaciones beneficiosas, perjudiciales y competitivas (Czerkawski, 1986). Es un sistema en constante cambio, en el cual los diferentes individuos están interrelacionados entre sí y con el medio y el hecho de que ocupen nichos diferentes o posean diferentes estrategias de utilización de los recursos hace posibles la conservación de la diversidad de las comunidades (Czerkawski, 1986). Existe un considerable grado de interdependencia entre las diferentes especies, utilizando unas los productos de deshecho del metabolismo de otras.

Atendiendo al proceso de degradación de polisacáridos y su posición en la cadena trófica los microorganismos pueden clasificarse en hidrolíticos, fermentativos y utilizadores de hidrógeno (Doré y Gouet, 1991). El primer ataque al alimento lo llevan a cabo los microorganismos hidrolíticos (fundamentalmente celulolíticos y amilolíticos) y como resultado de esta hidrólisis se liberan al medio oligosacáridos y azúcares sencillos que serán utilizados por otros grupos de microorganismos. Existe competencia entre las especies por los sustratos y el éxito de cada una dependerá del ritmo de transporte de los mismos al interior de la célula y su ritmo de fermentación. El siguiente paso en la cadena es la fermentación de oligosacáridos y azúcares simples, liberando al medio ácidos grasos volátiles, dióxido de carbono y agua. Por último, las arqueas metanogénicas utilizan el dióxido de carbono y el hidrógeno libre en el medio para formar metano.

Los microorganismos ruminales crecen y se desarrollan si las condiciones son adecuadas. En el rumen existe un flujo constante de contenido hacia el abomaso y, por tanto, el ritmo de división celular de los microorganismos debería ser mayor que ese ritmo de paso para asegurar su supervivencia. Sin embargo el rumen permite numerosos ritmos de crecimiento ya que muchos microorganismos se encuentran adheridos a las partículas de alimento y, aunque no contribuyen al flujo de proteína hacia el duodeno juegan un papel muy importante en la degradación de los alimentos fibrosos.

2.3.1 Bacterias

La mayor parte de las bacterias del rumen son anaerobias estrictas, pero existe un porcentaje considerable de ellas que son anaerobias facultativas, capaces de vivir en presencia de oxígeno y además, de utilizarlo (Van Soest, 1994). Las bacterias suponen el 50-60% de la masa microbiana del rumen (Stewart y Bryant, 1988) y de los grupos microbianos que viven en él son las que tienen el ritmo de generación más elevado y la menor tasa de retención, constituyendo, por consiguiente, la mayor fuente de nitrógeno para el rumiante.

Las bacterias que habitan el rumen se pueden clasificar de diferentes formas. Una de las más extendidas es la basada en el sustrato que utilizan (Yokohama y Johnson, 1988).

Los forrajes fibrosos se degradan por las denominadas bacterias celulolíticas. Su actividad se debe a un complejo enzimático extracelular con funciones específicas para la degradación de la celulosa, hidrolizando los

enlaces β 1-4 hasta glucosa (Yokohama y Johnson, 1988). Son anaerobias estrictas, y su rango óptimo de pH oscila entre 6,3 y 6,8; si el mismo desciende por debajo de 6,3 su actividad se ve afectada (Stewart, 1977). Existe la idea de que las bacterias que hidrolizan carbohidratos complejos utilizan nitrógeno amoniacal, mientras que las que fermentan azúcares simples utilizan proteína preformada (Russell *et al.*, 1992). Su ritmo de crecimiento depende además de la disponibilidad de ácidos grasos de cadena ramificada, siendo un grupo de crecimiento lento cuya tasa de renovación ronda las 18 horas. Predominan en el rumen cuando el animal recibe dietas con elevada proporción de forraje, disminuyendo su número si aumentan los carbohidratos solubles (Grant y Mertens, 1992). Como ácido graso principal producto de su metabolismo se obtiene ácido acético, y en menor medida ácido propiónico y ácido butírico. La hemicelulosa y las pectinas también son degradadas gracias a enzimas extracelulares producidas por algunas bacterias celulolíticas, y también hay grupos que utilizan específicamente estos sustratos (Van Soest, 1994).

El almidón se degrada por las bacterias amilolíticas por medio de enzimas extracelulares que rompen aleatoriamente los enlaces α 1-4 de las cadenas del mismo (Yokohama y Johnson, 1988). Tienen una tasa de duplicación mucho más baja que las celulolíticas (de 15 minutos a 4 horas). Sintetizan la proteína a partir de aminoácidos y también de amoníaco. Además son menos sensibles a las variaciones del pH ruminal, con un valor óptimo de crecimiento que oscila entre 5,5 y 6,6 (Hoover, 1986). Predominan en el rumen de animales alimentados con dietas con elevada proporción de carbohidratos solubles. Muchas bacterias amilolíticas también pueden fermentar azúcares sencillos y carbohidratos de bajo peso molecular liberados durante la hidrólisis de otros más complejos, pero sin adherirse a las partículas. Producen mayor cantidad de ácido propiónico que las celulolíticas.

Existen especies con una actividad degradante específica para un determinado sustrato. Algunas bacterias utilizan los ácidos orgánicos (láctico, succínico, fórmico) resultantes de la fermentación llevada a cabo por otros microorganismos (Wolin *et al.*, 1997). De esta forma se eliminan del medio ruminal productos que, de acumularse en exceso, podrían inhibir la fermentación (Ørskov y Ryle, 1990).

La proteína contenida en el alimento se degrada mediante enzimas producidas por las bacterias proteolíticas. En el proceso de degradación de la

cadena polipeptídica intervienen diferentes especies en cada uno de los pasos. En primer lugar se produce la proteólisis rompiéndose las proteínas y los péptidos entran al interior de las bacterias donde son degradados a aminoácidos que posteriormente formarán parte de la proteína microbiana o desaminados para dar lugar a ácidos grasos volátiles, amoníaco y ácidos carboxílicos (Stewart y Bryant, 1988). Los ácidos grasos volátiles producidos durante la fermentación de las proteínas son el isobutírico, el isovalérico y el 2-metilbutírico. Las bacterias pueden formar directamente aminoácidos a partir de nitrógeno no proteico (como amoníaco, nitratos y urea) y ácidos grasos volátiles. La urea es degradada por las bacterias ureolíticas que forman parte importante de la flora epimural.

2.3.2 *Arqueas metanogénicas*

Las arqueas existentes en el rumen son microorganismos anaerobios estrictos y producen metano a partir de la reacción del dióxido de carbono con hidrógeno gaseoso. Su funcionamiento puede ser inhibido por ciertos compuestos como los ionóforos o ciertos extractos de plantas. Al reducir la concentración de hidrógeno en el rumen regeneran el poder reductor de cofactores como el NAD⁺ y el FAD⁺, promoviendo así el crecimiento de otras especies. Cuando el animal consume alimento muy molido, o con elevada proporción de carbohidratos fácilmente degradables las arqueas metanogénicas ven reducido su número y se produce una disminución en la producción de metano. También existen bacterias capaces de generar metano mediante otras rutas, como por ejemplo a partir de metanol, metilamina y acético. Las arqueas metanogénicas son un grupo que tienen una supervivencia complicada en el rumen, ya que su tiempo de generación es superior a 4 días.

2.3.3 *Protozoos*

El número de protozoos en el rumen es menor que el de las bacterias pero su tamaño es mucho mayor que el de estas y pueden representar hasta el 40% del nitrógeno microbiano total (Jouany, 1996). Los protozoos ruminales son anaerobios estrictos y pertenecen a varios grupos que comúnmente se dividen en dos: holotricos y entodiniomorfos. Los holotricos tienen la superficie del cuerpo cubierta de cilios y su forma es ovalada o redondeada; son móviles y utilizan carbohidratos no estructurales. Los entodiniomorfos presentan una morfología más compleja y sus requerimientos nutritivos son más específicos. Pueden utilizar el almidón, la celulosa, la hemicelulosa, la pectina o azúcares solubles en función de los

grupos (Van Soest, 1994), produciendo en su fermentación ácidos grasos volátiles e hidrógeno que será posteriormente utilizado por las arqueas metanogénicas adheridas a su exterior para producir metano (Van Soest, 1994). Son también depredadores de bacterias, e incluso de protozoos de menor tamaño. Estos procesos de fagocitosis hacen difícil diferenciar su actividad enzimática de la de los microorganismos que han fagocitado y su actividad celulolítica puede ser debida a las bacterias que se encuentran en su interior. Poseen gran capacidad proteolítica, produciendo grandes cantidades de amoníaco, pero no tienen actividad ureasa ni pueden sintetizar aminoácidos a partir de compuestos nitrogenados simples (Jouany y Ushida, 1999), por lo que hacen uso de la proteína del alimento o de las bacterias (Williams y Coleman, 1992) constituyendo el nitrógeno bacteriano hasta el 72% del nitrógeno protozoario (Olubobokun *et al.*, 1988).

La cantidad de nitrógeno protozoario que alcanza el duodeno es menor que la de nitrógeno bacteriano ya que los protozoos tienen un tiempo de retención mayor en el rumen que las bacterias (Jouany y Ushida, 1999). Los protozoos contribuyen a la degradación ruminal de la fibra e incluso su presencia estimula la actividad celulolítica de las bacterias (Orpin, 1984; Demeyer, 1991) y reduce la actividad amilolítica. Además contribuyen a conseguir una pauta de fermentación más estable, disminuyendo el número de bacterias y su actividad a través de la predación y la competición por el sustrato (Nagaraja *et al.*, 1992). La capacidad de los protozoos para almacenar en su interior almidón y azúcares solubles evita su degradación rápida, ya que el sustrato se fermenta lentamente dentro de la célula y protege de descensos bruscos del pH del rumen si el animal recibe en la dieta gran cantidad de carbohidratos no estructurales (Yokohama y Johnson, 1988). Aun así, cuando el rumiante ingiere dietas con un nivel muy elevado de alimentos concentrados el número de protozoos disminuye, descenso debido a la lisis de los protozoos al ingerir elevadas cantidades de almidón o carbohidratos solubles y también al descenso del pH en el entorno ya que si este disminuye por debajo de 5,5 pueden llegar a desaparecer del rumen (Franzolin y Dehority, 1996). De todas formas la sensibilidad de los protozoos al pH varía con los grupos y, por ejemplo, las especies del género *Entodinium* toleran pH bajos, poseen elevados ritmos de crecimiento y suelen ser predominantes cuando los rumiantes consumen dietas con elevadas cantidades de concentrado (Van Soest, 1994).

No está claro el hecho de si los protozoos proporcionan beneficios al rumen pero Czerkawski (1986) apuntó que no existe análogos de ellos fuera

del ecosistema ruminal, lo cual indica que han sufrido una evolución conjunta con el resto de microorganismos ruminales, conservándose. Sin embargo, los animales defaunados pueden sobrevivir y los procesos de fermentación continúan en el rumen. La defaunación tiende a disminuir la pérdida de energía en forma de metano y el número de bacterias suele aumentar. Además aumenta la producción de proteína microbiana en el rumen y su flujo al abomaso (Dehority, 1993).

Algunos grupos de protozoos presentan largos tiempos de generación, desde 29 horas (Dehority, 2004) hasta dos o tres días (Sylvester *et al.*, 2009). Con la mayoría de las dietas el tiempo medio de retención de la fase líquida en el rumen es inferior a 24 horas, normalmente incluso menor de 10 por lo que es fundamental el secuestro de los protozoos en la fase sólida del rumen para su supervivencia. Cuando los protozoos pasan a tramos posteriores del tracto gastrointestinal y son degradados aportan al animal hospedador proteínas de excelente calidad, así como partículas de almidón no digeridas y ácidos grasos poliinsaturados.

2.3.4 Hongos

El hecho de que los hongos pueblan el rumen es conocido desde los años 70 del siglo pasado (Orpin, 1977). Anteriormente la zoospora era confundida con un protozoo flagelado, y como el hongo estaba firmemente adherido a las fibras de alimento, cuando se hacían preparaciones de filtrados ruminales estos quedaban en la parte sólida no utilizada.

Su densidad se ha calculado en torno a 10^4 zoosporas/mL (Mackie *et al.*, 2002). Tienen un largo tiempo de generación y aseguran su supervivencia en el rumen adhiriéndose a las partículas de alimento grandes (Orpin y Joblin, 1997). Son anaerobios y colonizan los tejidos lignocelulósicos de las plantas participando en la degradación de la fibra (Orpin y Joblin, 1997) introduciendo los filamentos rizoidales en el tejido vegetal y liberando un complejo enzimático que rompe los enlaces del alimento fibroso. Así, también facilitan el acceso de las bacterias que atacan entonces las fibras en los puntos de ruptura. Su eliminación del rumen causa un descenso en la degradación del alimento y, por tanto, una disminución en la ingesta, sobre todo de alimentos con bajo valor nutritivo.

Existen discrepancias en cuanto a los factores que afectan a la población fúngica del rumen. Mientras unos autores sugieren que su número aumenta con el contenido en fibra de la dieta (Grenet *et al.*, 1989) otros

señalan que este tipo de microorganismos no se ve afectado por el tipo de dieta ni por el pH ruminal (McAllister y Cheng, 1996).

2.4 Factores que afectan a la fermentación ruminal y a las poblaciones microbianas

2.4.1 Alimento

Tanto el tipo de alimento como su estructura afectan de forma importante a las poblaciones microbianas.

El tamaño de partícula del alimento que llega al rumen es un factor importante, ya que de él dependen los microorganismos para adherirse y por tanto su capacidad para degradarlo. Las bacterias son las principales encargadas de la degradación de los alimentos que son difícilmente degradables, como los forrajes de baja calidad, que presentan en su exterior barreras físicas o químicas que dificultan la adherencia a los mismos. A menudo se realizan estudios en los que diferentes tratamientos son probados en este tipo de forrajes para modificar las propiedades físicas o químicas de los mismos y, de esta forma, facilitar su digestión por parte de los microorganismos. Selim *et al.* (2002) realizaron un estudio en el que se comparó la población bacteriana ligada al alimento en el rumen de carneros alimentados en este caso con paja de arroz, tratada o no con amoníaco para aumentar su degradabilidad. La cantidad de bacterias se estimó a partir de la concentración de ácido diaminopimélico (DAPA) determinada por HPLC. El añadir el tratamiento con amoníaco a la paja hizo aumentar significativamente la población de bacterias adheridas a la fibra, especialmente a las partículas de menor tamaño. Esto fue achacado en un principio, además de a la facilidad de digestión de la paja al aporte extra de nitrógeno en una dieta que era, en principio, pobre en este componente, pero en un trabajo posterior Selim *et al.* (2004) realizaron el mismo estudio añadiendo además urea a la paja no tratada, confirmando que el efecto se debe al aumento en la degradabilidad de la paja. Otro estudio diferente (Chen *et al.*, 2008) analizó los efectos en las poblaciones microbianas del tratamiento de la paja de arroz con hidróxido de sodio o con bicarbonato amónico. En este caso el estudio fue realizado *in vitro* y las variaciones en las poblaciones microbianas se detectaban mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa (*quantitative PCR*, qPCR), y el efecto encontrado tras el tratamiento de la paja fue el aumento significativo de la abundancia de poblaciones fibrolíticas. Además se observó un incremento de la actividad enzimática fibrolítica lo que indica que el tratamiento del

alimento que supone una degradación previa del mismo favorece la actividad de microorganismos fibrolíticos.

2.4.2 Composición de la dieta

La composición de la dieta que llega al rumen es uno de los factores más influyentes en las poblaciones ruminales, tanto por las materias primas que la componen como por la proporción en que estos se encuentran.

Una gran cantidad de estudios se han planteado para evaluar las diferencias en la composición de las poblaciones de microorganismos ruminales en animales alimentados con dietas que diferían en la proporción de forraje y concentrado. Kocherginskaya *et al.* (2001) analizaron los efectos de dos dietas sobre la diversidad de las poblaciones microbianas del rumen de terneros. Una de las dietas estaba compuesta por un 50% de maíz y un 50% de forraje y la otra dieta consistía en heno administrado *ad libitum*. Las diferencias en las comunidades microbianas se evaluaron mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (*denaturing gradient gel electrophoresis*, DGGE) y posteriormente se construyeron a partir de estos resultados bibliotecas de clones. Encontraron claras diferencias en la composición de las comunidades bacterianas entre ambas dietas. Tajima *et al.* (2000) evaluaron los efectos de la transición de una dieta basada en forraje a una basada en concentrado (más del 90% de concentrado en la composición de la dieta) en las comunidades bacterianas de la fase líquida del rumen. Estas fueron analizadas mediante PCR seguida de clonación y secuenciación, encontrándose diferencias significativas entre ambas dietas, siendo las más llamativas la desaparición de los ruminococos en la dieta de elevado contenido de concentrado, prevaleciendo en la misma las bacterias productoras y utilizadoras de láctico. El trabajo concluye con una observación sobre la necesidad de profundizar en el estudio de las poblaciones ruminales mediante técnicas moleculares, ya que ofrecen una imagen más amplia de la diversidad ruminal en comparación con las técnicas de cultivo clásicas. Wanapat y Cherdthong (2009) también enfocaron su estudio en el efecto de la proporción de forraje en la dieta, en este caso, sobre las poblaciones de bacterias fibrolíticas en el búfalo. Se evaluaron 4 dietas en las que el forraje variaba entre un 25% y un 100% y las tres principales bacterias fibrolíticas (*Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes*). La abundancia relativa de las tres bacterias, que se estimó mediante qPCR, varió con la proporción forraje:concentrado. *F. succinogenes* fue la más abundante, y también la más afectada por la

variación en las proporciones de los elementos de la dieta. Por contra, Julien *et al.* (2010) no encontraron diferencias significativas entre las poblaciones ruminales cuando se administraban cuatro dietas que diferían en la proporción forraje:concentrado y la diversidad bacteriana fue evaluada mediante el polimorfismo conformacional de la cadena simple (*Single Strand Conformation Polymorphism*, SSCP).

Otra forma de evaluar, indirectamente, las variaciones en las poblaciones microbianas producidas por la dieta es el análisis de la actividad enzimática fibrolítica. Martin *et al.* (1999) analizaron la actividad fibrolítica en el rumen de vacas alimentadas con dos dietas consistentes en 100% de forraje o 60% de concentrado y 40% de forraje. La actividad enzimática fibrolítica fue menor en la dieta que incluía un 60% de concentrado. Las poblaciones de microorganismos asociados a la fibra juegan un papel fundamental en la degradación de la misma y por tanto en la cuantía de la actividad fibrolítica por lo que se puede suponer que hay mayor abundancia de microorganismos fibrolíticos si se obtiene un valor superior de actividad fibrolítica. Existen estudios que evaluaron la relación entre actividad fibrolítica y las tres principales poblaciones de bacterias fibrolíticas, así como la influencia de la dieta en las mismas en vacas (Tajima *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2001), en ovejas (Koike and Kobayashi, 2001; Michalet-Doreau *et al.*, 2001; Michalet-Doreau *et al.*, 2002; Koike *et al.*, 2003; Mosoni *et al.*, 2011) y búfalo (Wanapat y Cherdthong, 2009) sin prestarse atención a otras poblaciones microbianas con actividad fibrolítica demostrada, como lo son los hongos y los protozoos. De hecho, un estudio llevado a cabo por Martin *et al.* (2001) concluyó que la suplementación de la dieta con cereales varió la actividad fibrolítica, pero no la composición de la población bacteriana asociada a la fibra, por lo que podría sugerirse una variación en el resto de poblaciones de microorganismos encargados de la degradación de la fibra.

2.4.3 Animal hospedador

Existe elevada variabilidad entre animales en cuanto a la composición de la flora gastrointestinal (Mackie *et al.*, 1999). Esta variabilidad ha sido demostrada en diversos estudios en los rumiantes. Kocherginskaya *et al.* (2001) encontraron elevadas diferencias entre individuos en un estudio realizado con vacas al analizar la diversidad bacteriana mediante DGGE. Similares observaciones fueron apuntadas por Sundset *et al.* (2009) en un estudio que evaluaba la diversidad microbiana en el rumen de renos en Noruega mediante PCR y posterior clonación y

secuenciación y por Michalet-Doreau *et al.* (2001) que achacó las diferencias encontradas en las poblaciones de bacterias fibrolíticas en 4 ovejas, en gran parte, a la elevada variabilidad individual entre las mismas.

2.5 Métodos de estudio de las poblaciones microbianas

Los métodos utilizados para el estudio de la diversidad de comunidades microbianas que componen un ecosistema se pueden dividir en métodos microbiológicos y los basados en el análisis de los ácidos nucleicos. Hasta hace unos años, el ecosistema ruminal solo se estudiaba mediante técnicas basadas en cultivos microbianos, aislamiento y recuento y caracterización indirecta mediante los productos de fermentación. En los últimos años las técnicas de cultivo clásicas se han sustituido por las técnicas moleculares que permiten la identificación de un número más amplio de microorganismos (Raskin *et al.*, 1997).

2.5.1 Métodos microbiológicos

Están basados en las técnicas clásicas de cultivo y de conteo. Son métodos laboriosos y que sólo permiten la identificación de una pequeña parte de los microorganismos por lo que en la práctica no sirven para hacer una clasificación filogenética. La caracterización del ecosistema ruminal estuvo dificultada por las limitaciones impuestas por estas técnicas de cultivo (los microorganismos ruminales, en su mayoría, son anaerobios estrictos y con necesidades de cultivo desconocidas). Se considera que, en hábitats naturales, el número de microorganismos cultivables es de 10 a 100 veces inferior al conteo real (Brock, 1987). Mediante estos métodos se han llegado a conocer unas 200 especies de bacterias y unas 100 especies de hongos y protozoos, subestimando de manera importante tanto la diversidad microbiana como la abundancia de microorganismos que realmente existen en el rumen.

Las técnicas más utilizadas para el conteo de microorganismos eran la siembra en tubos de cultivo anaerobios (Hungate y Macy, 1973) y la técnica del número más probable (Dehority *et al.*, 1989). Para el estudio de la diversidad bacteriana se recurría a la determinación del perfil de fosfolípidos y ácidos grasos de la membrana celular (Minato *et al.*, 1988) o del contenido en citosina+guanina (Ogimoto e Imain, 1981). La identificación de especies microbianas se basaba en cultivos selectivos, tinciones, observaciones al microscopio o en el estudio de sus actividades metabólicas. Estas técnicas presentan dificultades como la imposibilidad de contar célula que, pese a ser de especies cultivables, están en fase de división; también puede inducir a

error la presencia de unidades formadoras de colonias formadas por conglomerados y no por células únicas o el hecho de que no todas las especies puedan crecer en el mismo medio de cultivo (Firkins y Yu, 2006). Estas técnicas presentan muchos inconvenientes: el desconocimiento de necesidades de cultivo de muchos microorganismos o el uso de medios demasiado selectivos, variaciones, sesgos o errores estadísticos derivados del conteo o la presencia, en el medio de cultivo, de productos intermedios de la degradación del sustrato, problemas asociados al manejo de los medios de cultivo (ausencia de anaerobiosis estricta, cantidad excesiva o deficiente de sustrato o tiempo de incubación demasiado corto) (Zoetendal *et al.*, 2004).

2.5.2 Métodos basados en ácidos nucleicos

Estos métodos están basados, principalmente, en la utilización, como marcadores taxonómicos, de los genes que codifican para la subunidad 16S del ribosoma bacteriano. La síntesis de proteína es una función conservada en todos los seres vivos, por lo que los genes que codifican para el ribosoma bacteriano (encargado de la síntesis de las mismas) tienen regiones altamente conservadas, en combinación con regiones altamente variables, que son las utilizadas para clasificar filogenéticamente los microorganismos (Spiegelman *et al.*, 2005). En el caso de los protozoos y hongos el gen diana de estas técnicas es el que codifica para la subunidad 18S del ribosoma.

El uso de la PCR ha sido crucial en el desarrollo de técnicas de caracterización microbiana independientes de los cultivos (Smith y Osborn, 2009). Estas técnicas que combinan la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) con una PCR posterior se han venido utilizando desde principios de los años 90, permitiendo un análisis del conjunto de comunidades microbianas presentes en un determinado ecosistema y revolucionando el conocimiento de la estructura y diversidad de dichas comunidades. Combinar la amplificación de un gen que permita una clasificación taxonómica (como es el del ribosoma 16S bacteriano) con una posterior técnica de huella genética (*fingerprinting*) o secuenciación ha permitido caracterizar la mayoría de poblaciones bacterianas que, hasta el momento, era imposible cultivar.

Como se ha indicado anteriormente, los métodos moleculares más ampliamente utilizados están basados en la PCR como paso previo al análisis de las muestras. A partir de ahí se separan los amplicones de las diferentes especies en función de determinadas características, inherentes a cada técnica.

La PCR amplifica exponencialmente el ADN que se encuentra en una muestra mediante sucesivos ciclos de desnaturalización, anillamiento de cebadores específicos y polimerización con nucleótidos con ayuda de una polimerasa estable en altas temperaturas (polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus*).

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

Esta técnica tiene limitaciones que deben ser tenidas en cuenta: la primera en referencia a la extracción de ADN previa a la realización de la PCR ya que cualquier tratamiento físico o químico de la muestra puede sesgar el resultado final (von Wintzingerode *et al.*, 1997); la lisis de los microorganismos previa a la extracción de ADN es un paso crítico ya que las bacterias Gram- se lisan más fácilmente que las Gram+ así que el tratamiento que no es suficiente para unas resulta excesivo para otras pudiéndose no extraer todo el ADN de la muestra o lisar parte del mismo y este ADN excesivamente fragmentado puede actuar como inhibidor de la PCR (von Wintzingerode *et al.*, 1997); una vez extraído el ADN pueden encontrarse en la muestra productos también extraídos de la misma simultáneamente que pueden inhibir la reacción. Diversos protocolos de extracción han sido descritos en la literatura, en función del tipo de muestra de la que se trate y del tipo de microorganismos presentes en la misma. En el caso del ecosistema ruminal también se han estudiado diversos métodos de extracción, siendo probado como el más eficaz el descrito por Yu y Morrison (2004) que combina la lisis celular con un tratamiento con bead-beater y solución de lisis y una extracción final con un kit comercial. Algo a tener en cuenta es el hecho de que, en un principio, el número de copias de cada fragmento, así como su longitud son diferentes en los diferentes microorganismos, y además son desconocidos, por tanto la PCR no puede utilizarse para realizar una cuantificación del número de copias de un gen presente en una muestra (Farrelly *et al.*, 1995), si no que sólo ofrece una idea de la diversidad que existe en la misma. Otro hecho importante a tener en cuenta es la elección de los cebadores, que deben ser específicos de la secuencia que se desea amplificar.

La secuencia utilizada para diferenciar filotípicamente a las especies bacterianas debe haber cambiado simultáneamente con la evolución del organismo y tener la longitud suficiente para producir cantidades de información relevantes (Woese, 1987). Se han utilizado los genes que codifican para diferentes proteínas, como son la ATPasa, girasa, factores de elongación del ADN o citocromos, sin embargo, con la secuencia que mejor resultado se ha obtenido es con la que codifica para el ARN ribosómico. Tanto en procariotas como en eucariotas se encuentran 3 tipos de ARN ribosómico: 16S, 23S y 5S en procariotas y 18S, 28S y 5,8S en eucariotas. Lo que hace que estas sean las secuencias más utilizadas son sus características, excelentes para la identificación taxonómica (Woese, 1987):

- son secuencias altamente conservadas
- tienen un elevado número de copias en cada célula
- están en todas las células y son esenciales para el funcionamiento de las mismas.

Además, en esta secuencia las regiones más conservadas simplemente permiten la diferenciación entre los reino Eukarya, Bacteria y Archaea mientras que las regiones más variables permiten la diferenciación de género y especie (von Wintzingerode *et al.*, 1997). Inicialmente se intentó utilizar la subunidad 5S por ser la más pequeña y, por tanto, de más fácil manejo. Sin embargo esta subunidad está compuesta tan solo por 120 nucleótidos por lo que no cuenta con regiones variables suficientes para diferenciar unos microorganismos de otros. Por ello la subunidad más utilizada es la 16S, que cuenta con un total de 1500 nucleótidos, prácticamente la mitad que la subunidad 23S por lo que se elige aquella en lugar de esta ya que es más fácil de secuenciar.

En algunos casos, la secuencia de la subunidad 16S no resulta suficiente para diferenciar algunos grupos, por lo que se proponen alternativas como la secuencia intergénica entre las regiones que codifican para la subunidad 16S y 23S en bacterias o la chaperonina 60 en eucariotas.

Los métodos más comúnmente utilizados para el estudio de la diversidad microbiana son los basados en la "huella genética" o métodos *fingerprinting*. Son útiles para estudiar de una manera rápida la estructura y diversidad de un ecosistema (Gerard, 1999). Consisten en una extracción de ADN seguida de amplificación de un fragmento mediante PCR y el análisis, mediante diferentes métodos, del resultado de la PCR. También es posible la

caracterización de los ecosistemas mediante la secuenciación y elaboración de biblioteca de clones, aunque esta es una técnica más laboriosa y lleva mucho más tiempo, por lo que es menos utilizada en el caso del ecosistema ruminal. Por último, para evaluar la abundancia de las diferentes poblaciones microbianas existen técnicas específicas como la PCR competitiva y, sobre todo, la qPCR.

2.5.2.1 SSCP: Polimorfismo conformacional de la cadena simple (Single strand conformation polymorphism)

Tras la realización de la PCR el producto resultante se somete a una desnaturalización, ya que la técnica se basa en la migración a través de un gel de la hebra simple del ADN. Las hebras del ADN adoptan una conformación tridimensional diferente en función de su secuencia debido a interacciones intramoleculares en las mismas. Las hebras migran de manera diferente en función de su conformación y de esta forma se pueden separar fragmentos con secuencias diferentes. Los amplicones, tras la PCR se someten a un proceso de desnaturalización, química o mediante calor, aunque actualmente es más frecuente el uso de lambda-exonucleasas, para conseguir ADN de hebra sencilla. Las muestras entonces se corren en un gel, normalmente de poliacrilamida, para separar los fragmentos diferentes. Este método fue originalmente desarrollado para detectar mutaciones en genes humanos (Orita *et al.*, 1989). Los genes de procariontes que codifican para el ARN ribosómico 16S están muy conservados y por tanto tienen tamaño similar en todas las especies por lo que esta técnica resulta útil ya que discrimina los amplicones según su secuencia.

La principal desventaja de este método es el hecho de que el ADN vuelve a unirse en doble hebra tras la desnaturalización inicial con lo que se forman heteroduplex que en la práctica llevan a la apreciación de más de una banda por especie (Lee *et al.*, 1996; Schwieger y Tebbe, 1998), problema que se soluciona realizando una digestión con una exonucleasa para eliminar una de las dos hebras del ADN (Schwieger y Tebbe, 1998). Otra desventaja es que si el microorganismo es poco abundante en el ecosistema (<1,5%) no se apreciará banda al revelar el gel (Lee *et al.*, 1996). La sensibilidad del SSCP puede ser afectada por otros factores como el tamaño de poro en el gel o el tamaño del fragmento de ADN, lo que lleva a que en una banda del gel haya más de un fragmento diferente y por tanto se subestime la diversidad de la muestra cuando estas son de comunidades complejas. Otro problema de esta técnica está asociado a la naturaleza de la secuencia de ADN codificante para

el 16S ya que posee una estructura secundaria muy estable por lo que el rango de estructuras que adopta al desnaturalizarse es muy poco amplio (Lee *et al.*, 1996).

Las ventajas que presenta sobre otras técnicas basadas en la separación por la secuencia, como DGGE, que es una técnica más sencilla de desarrollar ya que no necesita un cebador con el “*clamp*” guanina-citosina ni elaborar geles con gradiente desnaturalizante. Además tiene la ventaja de ser una técnica que se puede automatizar (como el RISA, *ribosomal intergenic spacer analysis*) usando un cebador marcado fluorescentemente y leyendo el gel en un secuenciador automático, lo que ofrece mayor sensibilidad.

2.5.2.2 RISA: Análisis la región espaciadora intergénica ribosomal (Ribosomal intergenic spacer analysis)

Es un método que proporciona información sobre la diversidad microbiana de una muestra y su composición. En esta técnica la parte del ADN amplificada no es la que codifica para la subunidad 16S del ribosoma si no que amplifica la parte que está entre los genes que codifican para esa subunidad y la subunidad 23S. Este fragmento varía notablemente en longitud (de 50 a 1500 pares de bases (Ranjard *et al.*, 2001)) y secuencia nucleotídica entre especies, cualidades ambas utilizadas en las técnicas de huella genética para diferenciación de fragmentos. En este caso es la variedad en la longitud la que se utiliza para diferenciar las diferentes especies. Tras la PCR, en la que se amplifica la región interribosomal los diferentes fragmentos se separan según su longitud mediante electroforesis. Cuando se comenzó a utilizar la técnica los fragmentos se separaban en un gel de poliacrilamida que posteriormente era teñido con plata para el revelado, siendo el resultado imágenes relativamente complejas (siempre en función de la composición bacteriana de origen) (Borneman y Triplett, 1997). Esta técnica era de elaboración engorrosa por el procesado del gel y pronto se desarrolla el llamado RISA automatizado o ARISA (*Automated ribosomal intergenic spacer analysis*) en el que los pasos iniciales de extracción de ADN y amplificación por PCR son iguales que en el anterior pero uno de los cebadores está marcado fluorescentemente por lo que la electroforesis posterior se realiza en un capilar a través de un polímero en un analizador automático de fragmentos (Fisher y Triplett, 1999; Ranjard *et al.*, 2001) que proporciona resultados de manera más rápida y precisa.

Tiene la ventaja de la rapidez, ya que no son necesarias digestiones con enzimas, geles engorrosos de preparar ni electroforesis de tiempo muy

largo. Además, al contrario que en otras técnicas de *fingreprinting* permite aislar las bandas para su posterior secuenciación.

2.5.2.3 RFLP: Polimorfismo de la longitud de los fragmento de restricción (Restriction fragment length polymorphism)

En esta técnica, tras la amplificación por PCR del fragmento de interés se someten los amplicones a una digestión con endonucleasas de restricción que cortan el ADN por unos determinados puntos, previamente conocidos. Parte de la base de que el punto dónde actúa la enzima no está en el mismo sitio en todas las especies por lo que se generarán fragmentos de diferente longitud en función del filotipo presente.

La más utilizada es la que analiza los fragmentos terminales (T-RFLP, *Terminal restriction fragment length polymorphism*): para ello uno de los cebadores está marcado fluorescentemente por lo que, tras la digestión con la enzima, los fragmentos terminales de cada especie quedan marcados fluorescentemente y cada uno es de una longitud diferente, por lo que pueden ser separados mediante electroforesis. Un secuenciador automático detecta las diferentes longitudes de los fragmentos y la intensidad de la fluorescencia pudiéndose clasificar los ecosistemas microbianos por su diversidad y riqueza en especies.

La ventaja de esta, al igual que el ARISA y el SSCP es el hecho que tras la digestión con las enzimas el análisis se realiza con un secuenciador automático, por lo que se elimina la posibilidad de sesgo por error humano y es rápido.

Una de las desventajas de esta técnica es el hecho de que la elección de las enzimas de restricción correctas para cada tipo de muestras requiere disponer de suficiente información previa para hacer el análisis con fiabilidad. Además es una técnica engorrosa, ya que requiere de un paso de digestión previo al análisis de los fragmentos en un secuenciador automático. También se ha demostrado que los resultados provenientes de una muestra analizada mediante T-RFLP sólo proporcionan información de las 50 especies más abundantes, pudiéndose subestimar de esta forma, la diversidad de las muestras.

2.5.2.4 DGGE: Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (Denaturing gradient gel electrophoresis)

El perfil que se crea de la comunidad microbiana estudiada depende de las proporciones que haya en la secuencia del ADN de adenina-timina y

guanina-citosina. Al someter a la doble hebra a condiciones desnaturalizantes, los enlaces adenina-timina y guanina-citosina que la mantienen unida se van rompiendo, adquiriendo la hebra una configuración espacial diferente lo que enlentece su ritmo de migrado en un gel hasta un punto en que se detiene. Es más difícil romper el enlace entre la guanina y la citosina por tener 3 enlaces por puente de hidrógeno en lugar de 2 como en el caso de la adenina y la timina. Por ello, cuanto mayor sea la proporción de guanina-citosina en una secuencia, más tardará en desnaturalizarse y más longitud recorrerá en el gel, separándose así unas hebras de otras. Los geles en que se corren estas muestras son especiales, contando con un producto desnaturalizante (formamida, urea) en una concentración creciente.

Esta es una técnica relativamente laboriosa, ya que incluye la realización de una PCR previa y el corrido del ADN en el gel es por un tiempo largo (desde 8 hasta 18 horas). Además exige la elaboración de un gel con gradiente desnaturalizante, ajustar este gradiente en función de las muestras que se pretenda analizar y el manejo del gel es más costoso que el de un gel de electroforesis normal.

2.5.2.5 TGGE: Electroforesis en gel con gradiente de temperatura (Temperature gradient gel electrophoresis)

Técnica de *fingerprinting* variante de la DGGE en la que la desnaturalización de los fragmentos se realiza mediante temperatura. El gel se somete a temperatura creciente de forma que los fragmentos se van desnaturalizando y dejan de migrar, tardando más cuanto más cantidad de guanina-citosina tenga el ADN. Posee el mismo grado de especificidad y las mismas ventajas y desventajas que la DGGE.

2.5.2.6 Secuenciación

La secuenciación se realiza a partir de ADN amplificado y aislado del resto de comunidades, bien sea mediante cultivo o mediante separación en gel. Es la técnica más directa para la clasificación de una muestra de un ecosistema microbiano, pero inviable cuando se trata de comunidades muy complejas, ya que los microorganismos pertenecientes a la misma no son cultivables en la gran mayoría de los casos (Amann *et al.*, 1995). Además es una técnica muy costosa y no ofrece información acerca de la abundancia relativa de cada comunidad.

2.5.2.7 PCR competitiva

En la PCR convencional o “en tiempo final” no se puede relacionar el producto obtenido con la cantidad de ADN presente en la muestra de partida. Esto es debido a que normalmente se alcanza con todas las secuencias presentes en la muestra una fase *plateau* en la que la concentración de las mismas es igual, independientemente de la cantidad de ADN de cada tipo que hubiera en la muestra de partida. Esto puede ser debido a desactivación de la Taq polimerasa, que sea limitante el número de nucleótidos o cebadores, reanillamiento de las secuencias de ADN o inhibición de la reacción. La PCR competitiva fue diseñada para superar estas dificultades en la cuantificación. Se basa en añadir a la muestra inicial un fragmento de ADN de concentración conocida y que pueda ser amplificado por los mismos cebadores (competidor). Además debe ser de distinto tamaño para que pueda ser separado fácilmente del ADN de la muestra mediante electroforesis. Tras terminar la reacción las cantidades amplificadas de ambos estarán relacionadas por un ratio, que será el mismo que la relación que exista entre las concentraciones iniciales de los dos, pudiéndose calcular de este modo la concentración de ADN que existía en la muestra (Zentilin y Giacca, 2007).

Presenta alguna ventaja con respecto a la qPCR: al realizarse la cuantificación al final de la reacción no está afectada por la cantidad de muestra inicial y la especificidad es muy alta; sin embargo se puede contaminar más fácilmente que la qPCR y la puesta en marcha del protocolo es más compleja ya que requiere el diseño del ADN competidor y su cuantificación precisa. El coste, en cambio, es más bajo en la PCR competitiva (Zentilin y Giacca, 2007).

2.5.2.8 Hibridación con sondas específicas

En este tipo de métodos un oligonucleótido de secuencia conocida se hibrida con su secuencia complementaria en una muestra de ADN procedente de una comunidad más o menos compleja. El oligonucleótido puede ser, al igual que los cebadores de la PCR más o menos específico, en función de si se intenta cuantificar la cantidad de bacterias totales o de un grupo concreto. Las sondas de hibridación son usadas con 3 propósitos: conocer la presencia de determinados grupos en la muestra, conocer su abundancia y determinar la distribución espacial de los mismos.

Las dos técnicas más representativas son la hibridación blot (*Blot hybridization* o *Southern hybridization*) y la hibridación *in situ* con

fluorescencia (FISH: *Fluorescence in situ hybridization*). En el primer caso la hibridación se realiza tras la realización de una técnica de *fingerprinting*. Los amplicones se transfieren a una membrana en la que se realiza la hibridación. En el FISH la hibridación se realiza con sondas fluorescentes, bien directamente en la muestra o en colonias aisladas de la misma mediante cultivo. La cuantificación se realiza midiendo la intensidad de fluorescencia emitida una vez la sonda se ha unido con la secuencia complementaria y comparándola con la fluorescencia emitida por un control de concentración conocida.

Una de las ventajas de estas técnicas es la gran variedad de información que pueden aportar. Además son técnicas aparentemente rápidas y sencillas y las sondas, *a priori*, poseen una gran especificidad. En el diseño de las sondas recae una de las principales desventajas, ya que si hay un fallo en la secuencia de la sonda no se producirá la unión con el ADN diana. Además, los microorganismos menos comunes, con secuencias no conocidas, no pueden ser detectados por esta técnica porque requiere un mínimo de fluorescencia para que esta sea detectable.

En el caso del ecosistema ruminal su uso es limitado por el escaso número de sondas existentes (Zoetendal *et al.*, 2004).

2.5.2.9 PCR cuantitativa (quantitative PCR, qPCR)

La principal ventaja de esta, respecto a la llamada PCR “en tiempo final” es que en la qPCR se cuantifican los amplicones durante la fase exponencial de amplificación, siendo la cantidad de fluorescencia proporcional a la cantidad de genes diana que había inicialmente en la muestra. En la PCR convencional al analizar los resultados, el amplicón mayoritario no siempre refleja el gen mayoritario en la muestra inicial. Además el uso de fluorescencia proporciona mayor sensibilidad a la técnica de qPCR.

La especificidad de la qPCR depende de lo específicos que sean los cebadores utilizados, pudiéndose cuantificar, por ejemplo, la población total de bacterias del rumen o la cantidad de la bacteria fibrolítica *Ruminococcus albus*.

La qPCR funciona de manera similar a la PCR convencional, con múltiples ciclos en los que el ADN es desnaturalizado, para permitir el anillamiento de los cebadores y la posterior elongación de los fragmentos, aumentando de esta forma exponencialmente el número de fragmentos. En la

qPCR el aumento del número de amplicones es registrado durante el proceso de PCR mediante detección de fluorescencia. Los sistemas más comúnmente utilizados son las sondas *Taqman* (Holland *et al.*, 1991; Livak *et al.*, 1995) y el *SYBR green* (Wittwer *et al.*, 1997).

El *SYBR green* se une a todas las hebras de ADN de doble cadena. Cuando está unido al ADN emite fluorescencia mientras que si se encuentra libre no la emite. Tras cada ciclo, al aumentar la cantidad de amplicones hay más cantidad de ADN de doble cadena, por lo tanto se emite y registra más fluorescencia. Como el *SYBR green* se une a cualquier hebra de ADN que sea de doble cadena es muy importante en este caso que los cebadores sean altamente específicos para evitar la formación de productos no deseados que contribuirían a aumentar la fluorescencia y por tanto sobreestimar la cantidad de ADN de la muestra. También deben evitarse los cebadores que muestren elevadas complementariedad entre ellos para evitar la formación de dímeros de cebadores (*primer-dimers*). Al usar este método, debe realizarse posteriormente a la PCR una curva de desnaturalización para así confirmar que la fluorescencia detectada es debida a la amplificación del segmento diana y no a fragmentos inespecíficos (Giglio *et al.*, 2003; González-Escalona *et al.*, 2006). En este proceso la temperatura se aumenta gradualmente desnaturalizando las dobles hebras de ADN y midiendo la fluorescencia tras cada aumento discreto de temperatura. La fluorescencia va disminuyendo a medida que se separan las hebras de ADN ya que el *SYBR green* queda libre. La temperatura a la que la fluorescencia se ha reducido al 50% sirve para identificar si la fluorescencia detectada es debida al segmento diana.

Las sondas *Taqman* tienen una longitud de 20 a 40 pares de bases y están marcadas fluorescentemente. Son complementarias con una región del segmento diana. La sonda está marcada en el extremo 5' mientras que en el extremo 3' tiene un inhibidor de dicha fluorescencia. Cuando la sonda no se ha unido el inhibidor está cerca del extremo 5' con lo que no se emite fluorescencia mientras que si la sonda se une al ADN la actividad exonucleasa de la polimerasa hará que se separe el fluoróforo y este comience a emitir fluorescencia. Este tipo de registro de la fluorescencia es más específico que el anterior, ya que en este caso solo se emite fluorescencia si la sonda se une a la secuencia diana. Además se pueden usar para una misma muestra diferentes sondas marcadas con diferentes fluoróforos y de esta forma se pueden cuantificar simultáneamente diferentes fragmentos (Baldwin *et al.*, 2003; Neretin *et al.*, 2003; Baldwin *et al.*, 2008).

La cuantificación del ADN se realiza mediante el método del “ciclo de cuantificación” (*quantification cycle*, C_q). El termociclador recoge la medida de fluorescencia después de cada ciclo de amplificación y el incremento de fluorescencia se registra junto con el número de ciclo resultando en la típica curva de amplificación que observamos en la Figura 2.2 y que presenta 4 estados: fluorescencia basal, amplificación exponencial, amplificación lineal y fase *plateau*.

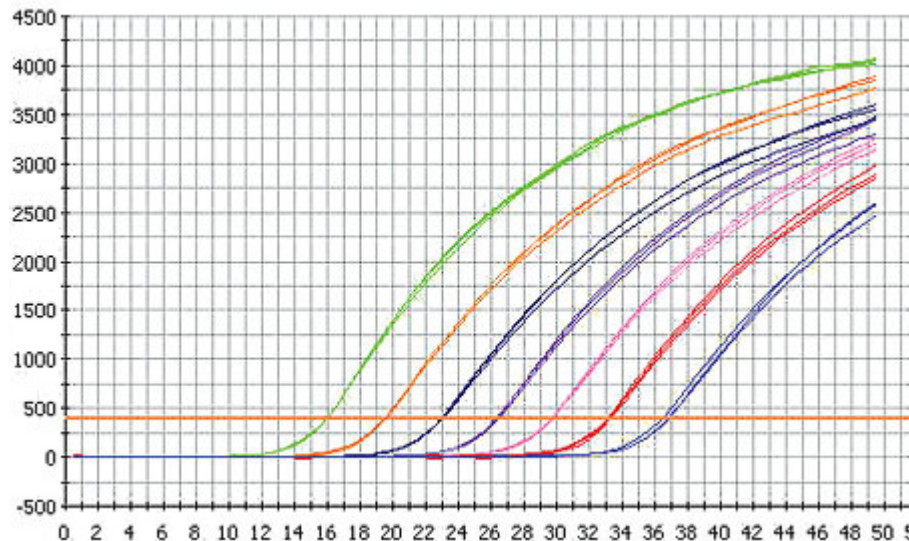


Figura 2.2: Curva de amplificación en la qPCR

Durante la fase exponencial de amplificación la cantidad del segmento diana amplificado es proporcional a la cantidad que había del mismo en la muestra de partida y es durante esta fase cuando los genes son cuantificados mediante el método del ciclo umbral (C_q). El C_q es alcanzado cuando la fluorescencia acumulada es significativamente mayor que la fluorescencia basal. En cuanto se supera el C_q el aumento exponencial del producto de PCR puede ser medido. Cuanto mayor es la concentración del segmento diana en la muestra de partida antes se alcanzará el C_q . Esta cuantificación puede realizarse de manera absoluta o relativa. En la cuantificación relativa los cambios en el gen diana son expresados en función de la cantidad de otro gen que, usualmente, no varía. Cualquier variación en la cantidad de este gen puede afectar el resultado final de la cuantificación relativa, sobre o subestimando la cantidad de muestra. Este método causa problemas especialmente en el caso de ADN de procariontes, por la dificultad para encontrar un gen estable sobre el cual poder realizar la cuantificación relativa. En la cuantificación absoluta el número de copias del gen diana puede ser cuantificado a partir de una curva estándar. Esta curva se realiza con diluciones seriadas de una muestra en la que se encuentra el gen diana

en una concentración conocida. Se determinan los C_q para cada dilución y se hace una regresión con ellos y el logaritmo de la concentración de gen. Con la recta obtenida se estiman las concentraciones del gen en las diferentes muestras. Este método, a pesar de considerarse cuantificación absoluta, es una cuantificación relativa en función de los datos obtenidos en una curva estándar; en la construcción de la misma pueden influir factores diversos, como la cuantificación de la muestra utilizada para elaborar la curva o las diluciones empleadas que influirán en el resultado de la cuantificación final.

Si el gen que se necesita cuantificar procede de una muestra compleja de un ecosistema la qPCR puede estar influida por otros factores como el método utilizado para la extracción o el tipo de ecosistema del que procede la muestra (Martin-Laurent *et al.*, 2001). El método utilizado para la extracción del ADN es muy importante y la eficiencia del mismo varía considerablemente entre métodos por lo que la concentración final en la muestra de ácidos nucleicos depende del método de extracción. En el rendimiento del proceso de extracción también influye el tipo de muestra de la que se trate. Además se utilizan diferentes métodos de extracción en los diferentes grupos de investigación lo que hace que resulte problemática la comparación de resultados entre los mismos. En las muestras procedentes del ambiente es muy importante la presencia de inhibidores de la PCR por lo que debe ser determinada *a priori* la dilución a utilizar para la realización de la PCR (Stults *et al.*, 2001) para asegurar que la muestra tenga la misma eficiencia de amplificación que las diluciones de la curva. Adicionalmente la sensibilidad de la prueba debe ser probada comparando los límites inferiores de fluorescencia detectados con un control negativo sin muestra. Cuando se trate de muestras de ecosistemas microbianos el número de copias del gen que codifica para la subunidad 16S del ribosoma no debe ser extrapolado a número de células ya que el número de copias de gen que tiene cada bacteria varía. Una de las aplicaciones más útiles de la qPCR es la de poder cuantificar genes funcionales implicados en diversos procesos biológicos. En el ecosistema ruminal, por ejemplo, en lugar de cuantificar todos los microorganismos relacionados con la producción de metano se puede cuantificar la cantidad de copias del gen que codifica para la enzima encargada de esa función fisiológica en lugar de cuantificar específicamente los microorganismos.

Tabla 2.3: Relación de trabajos dónde se utilizaron técnicas moleculares para el estudio del ecosistema ruminal, la técnica empleada y la especie en que se realizó el estudio

| | | | |
|-----------------------------------|---|-------|-------|
| Belanche <i>et al.</i> , 2010a | Description of development of rumen ecosystem by PCR assay in milk-fed, weaned and finished lambs in an intensive fattening system | qPCR | oveja |
| Belanche <i>et al.</i> , 2010b | Use of quantitative real-time PCR to assess the <i>in vitro</i> survival of specific DNA gene sequences of rumen microbes under simulated abomasal conditions | qPCR | oveja |
| Chen <i>et al.</i> , 2008 | Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid- and solid-associated ruminal microbes <i>in vitro</i> | qPCR | oveja |
| Cheng <i>et al.</i> , 2009 | Molecular diversity analysis of rumen methanogenic archaea from goat in eastern China by DGGE methods using different primer pairs | DGGE | cabra |
| Denman <i>et al.</i> , 2008 | Detection and monitoring of anaerobic rumen fungi using an ARISA method | ARISA | vaca |
| Denman y McSweeney, 2006 | Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen | qPCR | vaca |
| Denman <i>et al.</i> , 2007 | Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane | qPCR | vaca |
| Edwards <i>et al.</i> , 2008 | Dynamics of initial colonization of nonconserved perennial ryegrass by anaerobic fungi in the bovine rumen | ARISA | vaca |
| de la Fuente <i>et al.</i> , 2009 | Rumen protozoal diversity in the Spanish ibex (<i>Capra pyrenaica hispanica</i>) as compared with domestic goats (<i>Capra hircus</i>) | DGGE | cabra |
| Huws <i>et al.</i> , 2010 | Forage type and fish oil cause shifts in rumen bacterial diversity | DGGE | vaca |

| | | | |
|-------------------------------------|--|-----------------------|--------|
| Julien <i>et al.</i> , 2010 | Effects of varying proportions of concentrates on ruminal-reducing power and bacterial community structure in dry dairy cows fed hay-based diets | SSCP | vaca |
| Kocherginskaya <i>et al.</i> , 2001 | Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches | DGGE secuenciación | vaca |
| Koike <i>et al.</i> , 2003 | Kinetics of <i>in sacco</i> fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR | competitive PCR | oveja |
| Kongmun <i>et al.</i> , 2011 | Manipulation of rumen fermentation and ecology of swamp buffalo by coconut oil and garlic powder supplementation | DGGE | búfalo |
| Larue <i>et al.</i> , 2005 | Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and <i>rrs</i> gene sequencing | RISA DGGE | oveja |
| Li <i>et al.</i> , 2009 | PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium | DGGE qPCR | vaca |
| Martínez <i>et al.</i> , 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 | ARISA | oveja |
| McEwan <i>et al.</i> , 2005 | Rumen microbial population dynamics in response to photoperiod | DGGE | oveja |
| McSweeney y Denman, 2007 | Effect of sulfur supplements on cellulolytic rumen micro-organisms and microbial protein synthesis in cattle fed a high fibre diet | qPCR | vaca |
| Morgavi <i>et al.</i> , 2006 | Archaeal community structure diversity in the rumen of faunated and defaunated sheep | DGGE | oveja |

| | | | |
|---------------------------------------|---|--------------|-----------------|
| Mosoni <i>et al.</i> , 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 | qPCR | oveja |
| Mosoni <i>et al.</i> , 2011 | Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep | DGGE qPCR | oveja |
| Palmonari <i>et al.</i> , 2010 | Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents | ARISA | vaca |
| Ramos <i>et al.</i> , 2009 | Influence of detachment procedure and diet on recovery of solid-associated bacteria from sheep ruminal digesta and representativeness of bacterial isolates as assessed by automated ribosomal intergenic spacer analysis-polymerase chain reaction | ARISA | oveja |
| Regensbogenova <i>et al.</i> , 2004 | Rapid identification of rumen protozoa by restriction analysis of amplified 18S rRNA gene | RFLP | vaca / cabra |
| Sadet <i>et al.</i> , 2007 | PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium | DGGE | oveja |
| Sadet-Bourgeteau <i>et al.</i> , 2010 | Bacterial diversity dynamics in rumen epithelium of wethers fed forage and mixed concentrate forage diets | DGGE | oveja |
| Shaw, 2010 | Analysis of rumen bacterial populations in dairy cattle fed different forages | qPCR | vaca |
| Stahl <i>et al.</i> , 1988 | Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology | Hibridación | vaca |
| Sundset <i>et al.</i> , 2009 | Molecular diversity of the rumen microbiome of Norwegian reindeer on natural summer pasture | ARISA | reno |
| Sylvester <i>et al.</i> , 2005 | Evaluation of a real-time PCR assay quantifying the ruminal pool size and duodenal flow of protozoal nitrogen | qPCR | vaca |

| | | | |
|---------------------------------|---|-------------------|--------|
| Sylvester <i>et al.</i> , 2004 | Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR | qPCR | vaca |
| Tajima <i>et al.</i> , 1999 | Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries | biblioteca clones | vaca |
| Tajima <i>et al.</i> , 2000 | Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet | biblioteca clones | vaca |
| Tajima <i>et al.</i> , 2001 | Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens | biblioteca clones | vaca |
| Wanapat, 2010 | Current researches towards rumen fermentation and microbial ecology of swamp buffaloes | qPCR | búfalo |
| Wanapat y Cherdthong, 2009 | Use of real-time PCR technique in studying rumen cellulolytic bacteria population as affected by level of roughage in swamp buffalo | qPCR | búfalo |
| Weimer <i>et al.</i> , 2010 | Shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat-depressing conditions | ARISA | vaca |
| Weimer <i>et al.</i> , 2008 | Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations | qPCR | vaca |
| Welkie <i>et al.</i> , 2010 | ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle | ARISA | vaca |
| Yáñez Ruiz <i>et al.</i> , 2010 | The persistence of bacterial and methanogenic archaeal communities residing in the rumen of young lambs | T-RFLP | oveja |
| Yáñez-Ruiz <i>et al.</i> , 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 | qPCR DGGE | vaca |

2.6 Referencias bibliográficas

- Amann, R., W. Ludwig, K. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Asplund, J. M. 1994. The influence of energy on amino acid supply and utilization in the ruminant, en: *Principles of protein nutrition of ruminants*. Asplund, J. M., ed. CRC Press, Boca Ratón, Florida, EEUU.
- Baldwin, B. R., C. H. Nakatsu, L. Nies. 2008. Enumeration of aromatic oxygenase genes to evaluate monitored natural attenuation at gasoline-contaminated sites. *Water Res.* 42: 723-731.
- Baldwin, B. R., C. H. Nakatsu, L. Nies. 2003. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3350-3358.
- Belanche, A., J. Balcells, G. de la Fuente, D. R. Yañez-Ruíz, M. Fondevila, L. Calleja. 2010a. Description of development of rumen ecosystem by PCR assay in milk-fed, weaned and finished lambs in an intensive fattening system. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 94: 648-658.
- Belanche, A., I. R. Erroa, J. Balcells, L. Calleja. 2010b. Use of quantitative real-time PCR to assess the *in vitro* survival of specific DNA gene sequences of rumen microbes under simulated abomasal conditions. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 94: 204-211.
- Blaxter, K. L. 1967. *The energy metabolism of ruminants*. Springfield Ill, Thomas. Hutchinson, Londres, Reino Unido.
- Borneman, J., E. Triplett. 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2647-2653.
- Brock, T. D. 1987. The study of microorganisms *in situ*: progress and problems. *Symposium of Society for General Microbiology.* 41: 1-17.
- Chen, X. L., J. K. Wang, Y. M. Wu, J. X. Liu. 2008. Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid- and solid-associated ruminal microbes *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141: 1-14.
- Cheng, K. J., C. W. Forsberg, H. Minato, J. W. Costerton. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen, en: *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. Tsuda, T., Y. Sasaki, R. Kawashima, ed. Academic Press, San Diego, California, EEUU.
- Cheng, K. J., T. A. McAllister. 1997. Compartmentation in the rumen, en: *The rumen microbial ecosystem*. Hobson, P. N., C. S. Stewart, ed. Blackie Academic and Professional, Londres, Reino Unido.
- Cheng, Y. F., S. Y. Mao, J. X. Liu, W. Y. Zhu. 2009. Molecular diversity analysis of rumen methanogenic archaea from goat in eastern china by DGGE methods using different primer pairs. *Lett. Appl. Microbiol.* 48: 585-592.
- Czerkawski, J. W. 1986. *An introduction to rumen studies*. Pergamon Press, Oxford, Reino Unido.

- Czerkawski, J. W., G. Breckenridge. 1978. Use of the rumen simulation technique (Rusitec) to study the distribution of microbial matter in the solid and liquid phases of the reaction. *Proc. Nutr. Soc.* 37: 70A.
- Dehority, B. A., P. A. Tirabasso, A. P. Grifo. 1989. Most-probable-number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2789-2792.
- Dehority, B. A. 2004. *In vitro* determination of generation times for *Entodinium exiguum*, *Ophryoscolex purkynjei* and *Oudiplodinium maggii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51: 333-338.
- Dehority, B. A. 1993. *Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, EEUU.
- Demeyer, D. I. 1991. Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut, en: *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. Jouany, J. P., ed. INRA Editions, París, Francia.
- Denman, S. E., M. J. Nicholson, J. L. Brookman, M. K. Theodorou, C. S. McSweeney. 2008. Detection and monitoring of anaerobic rumen fungi using an ARISA method. *Lett. Appl. Microbiol.* 47: 492-499.
- Denman, S. E., C. S. McSweeney. 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., N. W. Tomkins, C. S. McSweeney. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 313-322.
- Dobson, A. 1959. Active transport through the epithelium of the reticulo-rumen sac. *J. Physiol.* 146: 235-251.
- Doré, J., P. H. Gouet. 1991. Microbial interactions in the rumen, en: *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. Jouany, J. P., ed. INRA Editions, París, Francia.
- Edwards, J. E., A. H. Kingston-Smith, H. R. Jimenez, S. A. Huws, K. P. Skøt, G. W. Griffith, N. R. McEwan, M. K. Theodorou. 2008. Dynamics of initial colonization of nonconserved perennial ryegrass by anaerobic fungi in the bovine rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66: 537-545.
- FAOSTAT. 2010. Bases de datos estadísticos de la FAO. <http://faostat.fao.org>. Consultado el 12/03/2012.
- Farrelly, V., F. Rainey, E. Stackebrandt. 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2798-2801.
- Firkins, J. L., Z. Yu. 2006. Characterisation and quantification of the microbial populations of the rumen, en: *Ruminant physiology*. Serjssen, K., T. Hevelplund, M. O. Nielsen, ed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Holanda.
- Fisher, M. M., E. W. Triplett. 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4630-4636.

- Franzolin, R., B. A. Dehority. 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *J. Anim. Sci.* 74: 2803-2809.
- de la Fuente, G., A. Belanche, L. Abecia, B. A. Dehority, M. Fondevila. 2009. Rumen protozoal diversity in the Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) as compared with domestic goats (*Capra hircus*). *Eur. J. Protistol.* 45: 112-120.
- Giglio, S., P. T. Monis, C. P. Saint. 2003. Demonstration of preferential binding of SYBR green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucl. Acids Res.* 31: e136.
- González-Escalona, N., A. Fey, M. G. Höfle, R. T. Espejo, C. A. Guzmán. 2006. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock. *Environ. Microbiol.* 8: 658-666.
- Grant, R. H., D. R. Mertens. 1992. Influence of buffer pH and raw corn starch addition on *in vitro* fiber digestion kinetics. *J. Dairy Sci.* 75: 2762-2768.
- Grenet, E., A. Breton, P. Barry, G. Fonty. 1989. Rumen anaerobic fungi and plant substrate colonization as affected by diet composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 26: 55-70.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson, D. H. Gelfand. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *PNAS.* 88: 7276-7280.
- Hoover, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69: 2755-2766.
- Hungate, R. E., J. Macy. 1973. The roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. *Bull. Ecol. Res. Comm.* 17: 123-126.
- Huws, S. A., M. R. F. Lee, S. M. Muetzel, M. B. Scott, R. J. Wallace, N. D. Scollan. 2010. Forage type and fish oil cause shifts in rumen bacterial diversity. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73: 396-407.
- Jouany, J. P., K. Ushida. 1999. The role of protozoa in feed digestion (a review). *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* 12: 113-128.
- Jouany, J. 1996. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *J. Nutrit.* 126: 1335S-1346S.
- Julien, C., J. P. Marden, C. Bonnefont, R. Moncoulon, E. Auclair, V. Monteils, C. Bayourthe. 2010. Effects of varying proportions of concentrates on ruminal-reducing power and bacterial community structure in dry dairy cows fed hay-based diets. *Animal.* 4: 1641-1646.
- Kocherginskaya, S. A., R. I. Aminov, B. A. White. 2001. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe.* 7: 119-134.
- Koike, S., Y. Kobayashi. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 361-366.

- Koike, S., J. Pan, Y. Kobayashi, K. Tanaka. 2003. Kinetics of *in sacco* fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *J. Dairy Sci.* 86: 1429-1435.
- Kongmun, P., M. Wanapat, P. Pakdee, C. Navanukraw, Z. Yu. 2011. Manipulation of rumen fermentation and ecology of swamp buffalo by coconut oil and garlic powder supplementation. *Livest. Sci.* 135: 84-92.
- Larue, R., Z. Yu, V. A. Parisi, A. R. Egan, M. Morrison. 2005. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and *rrs* gene sequencing. *Environ. Microbiol.* 7: 530-543.
- Lee, D., Y. Zo, S. Kim. 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3112-3120.
- Li, L., G. B. Penner, E. Hernandez-Sanabria, M. Oba, L. L. Guan. 2009. Effects of sampling location and time, and host animal on assessment of bacterial diversity and fermentation parameters in the bovine rumen. *J. Appl. Microbiol.* 107: 1924-1934.
- Livak, K. J., S. J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, K. Deetz. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Res.* 4: 357-362.
- Mackie, R. I., C. S. McSweeney, A. V. Klieve. 2002. Microbial ecology of ovine rumen, en: *Sheep nutrition*. Feer, M., H. Dove, ed. CABI Publishing, Australia.
- Mackie, R. I., A. Sghir, H. R. Gaskins. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 1035S-1045S.
- MAGRAMA. 2011. Resultados de las encuestas de ganado ovino-caprino. Informe de noviembre de 2011. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Secretaría General Técnica. Subdirección General de Estadística. Madrid, España.
- Martin, C., L. Millet, G. Fonty, B. Michalet-Doreau. 2001. Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community associated with rumen solid digesta. *Reprod. Nutr. Dev.* 41: 413-424.
- Martin, C., E. Devillard, B. Michalet-Doreau. 1999. Influence of sampling site on concentrations and carbohydrate-degrading enzyme activities of protozoa and bacteria in the rumen. *J. Anim. Sci.* 77: 979-987.
- Martin-Laurent, F., L. Philippot, S. Hallet, R. Chaussod, J. C. Germon, G. Soulas, G. Catroux. 2001. DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2354-2359.
- Martínez, M. E., M. J. Ranilla, M. L. Tejido, C. Saro, M. D. Carro. 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.
- McAllister, T. A., K. Cheng. 1996. Microbial strategies in the ruminal digestion of cereal grains. *Anim. Feed Sci. Technol.* 62: 29-36.

- McEwan, N. R., L. Abecia, M. Regensbogenova, C. L. Adam, P. A. Findlay, C. J. Newbold. 2005. Rumen microbial population dynamics in response to photoperiod. *Lett. Appl. Microbiol.* 41: 97-101.
- McSweeney, C. S., S. E. Denman. 2007. Effect of sulfur supplements on cellulolytic rumen micro-organisms and microbial protein synthesis in cattle fed a high fibre diet. *J. Appl. Microbiol.* 103: 1757-1765.
- Michalet-Doreau, B., I. Fernandez, C. Peyron, L. Millet, G. Fonty. 2001. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod. Nutr. Dev.* 41: 187-194.
- Michalet-Doreau, B., I. Fernandez, G. Fonty. 2002. A comparison of enzymatic and molecular approaches to characterize the cellulolytic microbial ecosystems of the rumen and the cecum. *J. Anim. Sci.* 80: 790-796.
- Minato, H., S. Ishibashi, T. Hamaoka. 1988. Cellular fatty acid and sugar composition of representative strains of rumen bacteria. *J. Gen Appl. Microbiol.* 34: 303-319.
- Morgavi, D. P., J. P. Jouany, C. Martin, M. J. Ranilla. 2006. Archaeal community structure diversity in the rumen of faunated and defaunated sheep. *Int. Congr. Ser.* 1293: 127-130.
- Mosoni, P., F. Chaucheyras-Durand, C. Béra-Maillet, E. Forano. 2007. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: Effect of a yeast additive. *J. Appl. Microbiol.* 103: 2676-2685.
- Mosoni, P., C. Martin, E. Forano, D. P. Morgavi. 2011. Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.* 89: 783-791.
- Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE. A method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 317-322.
- Nagaraja, T. G., G. Towne, A. A. Beharka. 1992. Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2410-2414.
- Neretin, L. N., A. Schippers, A. Pernthaler, K. Hamann, R. Amann, B. B. Jørgensen. 2003. Quantification of dissimilatory (bi)sulphite reductase gene expression in *Desulfobacterium autotrophicum* using real-time RT-PCR. *Environ. Microbiol.* 5: 660-671.
- Ogimoto, K., S. Imain. 1981. Rumen bacteria, en: *Atlas of rumen microbiology*. Japan Society Press, Japón.
- Olubobokun, J. A., W. M. Craig, W. A. Nipper. 1988. Characteristics of protozoal and bacterial fractions from microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J. Anim. Sci.* 66: 2701-2710.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *PNAS.* 86: 2766-2770.

- Orpin, C. G., K. N. Joblin. 1997. The rumen anaerobic fungi, en: *The rumen microbial ecosystem*. Hobson, P. N., C. S. Stewart, ed. Chapman and Hall, Londres, Reino Unido.
- Orpin, C. G. 1984. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10: 121-143.
- Orpin, C. G. 1977. Invasion of plant tissue in the rumen by the flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen. Microbiol.* 98: 423-430.
- Ørskov, E. R., M. Ryle. 1990. *Energy nutrition in ruminants*. Elsevier Applied Science Publishers, Barking, Reino Unido.
- Palmonari, A., D. M. Stevenson, D. R. Mertens, C. W. Cruywagen, P. J. Weimer. 2010. pH dynamics and bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93: 279-287.
- Ramos, S., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, M. E. Martínez, C. Saro, M. D. Carro. 2009. Influence of detachment procedure and diet on recovery of solid-associated bacteria from sheep ruminal digesta and representativeness of bacterial isolates as assessed by automated ribosomal intergenic spacer analysis-polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* 92: 5659-5668.
- Ranjard, L., F. Poly, J. Lata, C. Mougél, J. Thioulouse, S. Nazaret. 2001. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4479-4487.
- Raskin, L., W. C. Capman, R. Sharp, L. K. Poulson, D. A. Stahl. 1997. Molecular ecology of gastrointestinal systems, en: *Gastrointestinal microbiology*. Mackie, R. I., B. A. White, R. Isaacson, ed. Chapman and Hall, Nueva York, EEUU.
- Regensbogenova, M., S. Kisidayova, T. Michalowski, P. Javorsky, S. Y., Moon-Van Der Staay, G. W. M. Moon-Van Der Staay, J. H. P. Hackensteen, N. R. McEwan, J. Jouany, C. J. Newbold. 2004. Rapid identification of rumen protozoa by restriction analysis of amplified 18S rRNA gene. *Acta Protozool.* 43: 219-224.
- Russell, J. B., J. D. O'Connor, D. G. Fox, P. J. Van Soest, C. J. Sniffen. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.* 70: 3551-3561.
- Sadet, S., C. Martin, B. Meunier, D. P. Morgavi. 2007. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal.* 1: 939.
- Sadet-Bourgeteau, S., C. Martin, D. P. Morgavi. 2010. Bacterial diversity dynamics in rumen epithelium of wethers fed forage and mixed concentrate forage diets. *Vet. Microbiol.* 146: 98-104.
- Schwieger, F., C. C. Tebbe. 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4870-4876.
- Selim, A. S. M., J. Pan, T. Suzuki, K. Ueda, Y. Kobayashi, K. Tanaka. 2002. Postprandial changes in particle associated ruminal bacteria in sheep fed ammoniated rice straw. *Anim. Feed Sci. Technol.* 102: 207-215.

- Selim, A. S. M., J. Pan, T. Takano, T. Suzuki, S. Koike, Y. Kobayashi, K. Tanaka. 2004. Effect of ammonia treatment on physical strength of rice straw, distribution of straw particles and particle-associated bacteria in sheep rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115: 117-128.
- Shaw, C. 2010. Analysis of rumen bacterial populations in dairy cattle fed different forages. Tesis de Máster. Ohio State University.
- Smith, C. J., A. M. Osborn. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67: 6-20.
- Spiegelman, D., G. Whissell, C. W. Greer. 2005. A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Can. J. Microbiol.* 51: 355-386.
- Stahl, D. A., B. Flesher, H. R. Mansfield, L. Montgomery. 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1079-1084.
- Stewart, C. S. 1977. Factors affecting the cellulolytic activity of rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 497-502.
- Stewart, C. S., M. P. Bryant. 1988. The rumen bacteria, en: *The rumen microbial ecosystem*. Hobson, P. N., C. S. Stewart, ed. Elsevier Science Publishing Co., Nueva York, EEUU.
- Stults, J. R., O. Snoeyenbos-West, B. Methe, D. R. Lovley, D. P. Chandler. 2001. Application of the 5' fluorogenic exonuclease assay (TaqMan) for quantitative ribosomal DNA and rRNA analysis in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2781-2789.
- Sundset, M., J. Edwards, Y. Cheng, R. Senosiain, M. Fraile, K. Northwood, K. E. Praesteng, T. Glad, S. D. Mathiesen, A. D. Wright. 2009. Molecular diversity of the rumen microbiome of Norwegian reindeer on natural summer pasture. *Microb. Ecol.* 57: 335-348.
- Sylvester, J. T., S. K. R. Karnati, Z. Yu, C. J. Newbold, J. L. Firkins. 2005. Evaluation of a real-time PCR assay quantifying the ruminal pool size and duodenal flow of protozoal nitrogen. *J. Dairy Sci.* 88: 2083-2095.
- Sylvester, J. T., S. K. R. Karnati, Z. Yu, M. Morrison, J. L. Firkins. 2004. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. *J. Nutr.* 134: 3378-3384.
- Sylvester, J. T., S. K. R. Karnati, B. A. Dehority, M. Morrison, G. L. Smith, N. St-Pierre, J. L. Firkins. 2009. Rumen ciliated protozoa decrease generation time and adjust 18S ribosomal DNA copies to adapt to decreased transfer interval, starvation, and monensin. *J. Dairy Sci.* 92: 256-269.
- Tajima, K., R. I. Aminov, T. Nagamine, K. Ogata, M. Nakamura, H. Matsui, Y. Benno. 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 159-169.
- Tajima, K., S. Arai, K. Ogata, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura, R. I. Aminov, Y. Benno. 2000. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe.* 6: 273-284.

- Tajima, K., T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura, R. I. Aminov. 2001. 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 Microbiol. Lett.* 200: 67-72.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell University Press. Ithaca, Nueva York, EEUU.
- Wanapat, M. 2010. Current researches towards rumen fermentation and microbial ecology of swamp buffaloes. *Proc. International Conference on Biochemistry and Medical Chemistry*, Cambridge, Reino Unido.
- Wanapat, M., A. Cherdthong. 2009. Use of real-time PCR technique in studying rumen cellulolytic bacteria population as affected by level of roughage in swamp buffalo. *Curr. Microbiol.* 58: 294-299.
- Weimer, P. J., D. M. Stevenson, D. R. Mertens. 2010. Shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat-depressing conditions. *J. Dairy Sci.* 93: 265-278.
- Weimer, P. J., D. M. Stevenson, D. R. Mertens, E. E. Thomas. 2008. Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 135-145.
- Welkie, D. G., D. M. Stevenson, P. J. Weimer. 2010. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe.* 16: 94-100.
- Weston, R. H., J. P. Hogan. 1968. The digestion of pasture plants by sheep. I. ruminal production of volatile fatty acids by sheep offered diets of ryegrass and forage oats. *Aust. J. Agric. Res.* 19: 419-432.
- Williams, A. G., G. S. Coleman. 1992. *The rumen protozoa*. Springer-Verlag, Nueva York, EEUU.
- von Wintzingerode, F., U. B. Göbel, E. Stackebrandt. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21: 213-229.
- Wittwer, C. T., M. G. Herrmann, A. A. Moss, R. P. Rasmussen. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques.* 22: 130-138.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 51: 221-271.
- Wolin, M. J., T. L. Miller, C. S. Stewart. 1997. Microbe-microbe interactions, en: *The rumen microbial ecosystem*. Hobson, P. N., C. S. Stewart, ed. Blackie Academic and Professional, Londres, Reino Unido.
- Yáñez Ruiz, D. R., B. Macías, E. Pilonche, C. J. Newbold. 2010. The persistence of bacterial and methanogenic archaeal communities residing in the rumen of young lambs. *FEMS Microbiol Ecol.* 72: 272-278.
- Yáñez-Ruiz, D. R., N. D. Scollan, R. J. Merry, C. J. Newbold. 2006. Contribution of rumen protozoa to duodenal flow of nitrogen, conjugated linoleic acid and vaccenic acid in steers fed silages differing in their water-soluble carbohydrate content. *Br. J. Nutr.* 96: 861-869.

- Yokohama, M. T., K. A. Johnson. 1988. Microbiology of the rumen and intestine, en: *The ruminant animal. Digestive physiology and nutrition*. Church, D. C., ed. Prentice Hall, Nueva Jersey, EEUU.
- Yu, Z., M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques*. 36: 808-812.
- Zentilin, L., M. Giacca. 2007. Competitive PCR for precise nucleic acid quantification. *Nat. Protocols*. 2: 2092-2104.
- Zoetendal, E. G., C. T. Collier, S. Koike, R. I. Mackie, H. R. Gaskins. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J. Nutr.* 134: 465-472.

CAPÍTULO 3
MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Animales y dietas experimentales

En las pruebas experimentales se utilizaron 4 ovejas adultas de raza merina con un peso vivo (media \pm error estándar de la media) de $58,5 \pm 3,16$ kg. Todas las ovejas fueron equipadas con una cánula ruminal rígida de plástico (40 mm de diámetro interno) implantada en el saco dorsal del rumen. La colocación de la cánula se llevó a cabo mediante la técnica de doble incisión (Komarek, 1981). Los animales no recibieron alimento durante las 24 horas previas a la intervención quirúrgica y estuvieron privados de agua durante 12 horas antes de la operación. El tratamiento postoperatorio consistió en un antibiótico de amplio espectro durante 7 días, limpiándose la zona intervenida diariamente con agua templada y yodo diluido.

Durante todo el periodo experimental las ovejas estuvieron alojadas en jaulas individuales, donde recibieron la dieta que correspondiera en función de la prueba planteada. Los animales dispusieron continuamente de agua y un bloque corrector vitamínico-mineral. Las ovejas fueron manejadas de acuerdo con la Guía para el Uso y Cuidado de Animales Experimentales en España y todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Manejo y Cuidado de Animales de la Universidad de León.

Para los diferentes experimentos se formularon 4 dietas experimentales, constituidas por forraje (heno de alfalfa o heno de gramíneas) y un concentrado comercial formulado para ovejas en lactación. Las dietas tenían una relación forraje:concentrado (F:C; sobre materia seca, MS) de 70:30 o 30:70 siendo el forraje heno de alfalfa o heno de gramíneas. La composición química de las dietas se muestra en la Tabla 3.1. El heno de alfalfa fue recogido en el segundo corte con un 30% de floración y con contenidos de 91,3% de MS, 2,67% de N, 46,6% de fibra neutro detergente (FND) y 33,1% de fibra ácido detergente (FAD) (sobre MS). El heno de gramíneas consistió en raigrás perenne (81%), trébol blanco y rojo (11%) y otras hierbas (8%). Fue recogido en estado de postfloración y contenía 93,3% de MS, 1,46% de N, 56,9% de FND y de 28,6% FAD (sobre MS). El concentrado estaba compuesto por cebada, gluten feed, harinillas de trigo, torta de soja, harina de palma, trigo, maíz y una mezcla vitamínico-mineral en proporciones de 215, 204, 200, 135, 115, 50, 50 y 31 g/kg respectivamente (sobre materia fresca, MF) y la composición era de 91,4% MS, 3,04% N, 33,5% FND y 12,5% FAD (sobre MS). Las dietas se administraban a los animales en dos tomas iguales diarias a las 8:00 y 20:00 horas.

Tabla 3.1: Composición química de las dietas experimentales con una relación forraje:concentrado 70:30 (HF) o 30:70 (HC) y heno de alfalfa (A) o heno de gramíneas (G) como forraje

| Parámetro | HFA | HFG | HCA | HCG |
|-----------------------------|------|------|------|------|
| MS, % | 92,7 | 92,5 | 92,5 | 92,4 |
| MO, % MS | 91,3 | 92,7 | 91,3 | 91,9 |
| N, % MS | 2,69 | 1,94 | 2,83 | 2,56 |
| FND, % MS | 42,6 | 49,9 | 37,4 | 40,1 |
| FAD, % MS | 26,9 | 23,8 | 18,7 | 17,4 |
| EM, ¹ Mcal/kg MS | 2,12 | 2,00 | 2,45 | 2,39 |

¹ Energía metabolizable. Estimado de acuerdo a NRC (2007).

3.2 Procedimientos experimentales y toma de muestras

Se realizaron dos pruebas experimentales con animales. En la primera de ellas se utilizaron las 4 dietas formuladas, que se administraron a los animales en un diseño experimental de cuadrado latino 4 x 4. Este estudio se realizó simultáneamente con una prueba experimental diseñada para determinar el valor nutritivo de las dietas (Ramos *et al.*, 2009). Las dietas se ofrecieron a los animales a un nivel restringido de 52 g MS/kg peso vivo^{0,75}, con el objetivo de minimizar la selección de alimentos.

Cada periodo experimental tuvo una duración de 22 días, de los cuales los primeros 21 se destinaron a la adaptación a la dieta. En el día 22 se tomaron aproximadamente 400 g de contenido ruminal a través de la cánula de cada oveja, inmediatamente antes de la primera administración del alimento, y se filtraron a través de 4 capas de gasa.

La digesta sólida se mezcló con 100 mL de solución salina (0,9% NaCl) y se volvió a filtrar para eliminar del sólido las bacterias no asociadas a la fase sólida de la digesta (SAB). Este procedimiento fue repetido una vez más y ambos filtrados se unieron a la fase líquida de la digesta para aislar las bacterias asociadas a la fase líquida de la digesta (LAB) por centrifugación diferencial (ver Figura 3.1).

Aproximadamente 100 g de digesta sólida se mezclaron con solución salina (0,9% NaCl; 3 mL/g) que contenía un 0,1% de metilcelulosa y se mantuvieron durante 15 min a 39°C en un baño con agitación continua (65 revoluciones por minuto (rpm)). Posteriormente, se añadieron 50 mL de solución salina a 4°C con un 0,1% de metilcelulosa y se almacenaron durante

24 h a 4°C. Las muestras se homogeneizaron 10 s en una batidora de varillas y fueron centrifugadas a 500 x g durante 10 min a 4°C. A continuación, se recuperó el sobrenadante y el sólido se resuspendió 2 veces más en solución salina con un 0,1% de metilcelulosa y se recentrifugó (500 x g; 10 min; 4°C). Finalmente, todos los sobrenadantes se mezclaron y se centrifugaron (20 000 x g; 25 min; 4°C) para aislar las SAB.

Los pellets de LAB y SAB se lavaron y resuspendieron en solución salina y la centrifugación se repitió. Finalmente, los pellets se liofilizaron y de ellos se extrajo el ácido desoxirribonucleico (ADN) para analizar la diversidad bacteriana mediante análisis automatizado de la región espaciadora intergénica ribosomal (ARISA).

En la segunda de las pruebas se utilizaron las mismas 4 ovejas, en este caso en un diseño cruzado. Para la prueba se utilizaron únicamente las dos dietas con un 70% de forraje (heno de alfalfa o heno de gramíneas). Los dos periodos experimentales tuvieron una duración de 24 días cada uno, repartidos en 21 días de adaptación y 3 días para toma de muestras. Los días 22 y 24 de cada periodo se procedió a la toma de muestras. Se tomaron muestras de contenido ruminal (500 g) de cada animal a través de la cánula inmediatamente antes (0 h) y a las 4 y 8 h tras la administración de la primera toma de alimento. Una submuestra de aproximadamente 50 g se separó para determinar el contenido en MS. El resto del contenido se filtró a través de 4 capas de gasa, se midió el pH del líquido ruminal y el contenido sólido se mezcló antes de la toma de muestras. Se tomaron las muestras del líquido ruminal y contenido sólido que se detallan a continuación.

3.2.1 Muestras de líquido ruminal

-Muestras para la extracción de ADN (10 mL) y caracterización de la población microbiana: Estas muestras se congelaron a -80°C y posteriormente fueron liofilizadas.

-Muestras para determinar la actividad enzimática (10 mL): Estas muestras se congelaron a -80°C hasta su análisis.

-Muestras para determinar los principales parámetros ruminales: Dos mL se mezclaron con 2 mL de HCl 0,5 M y se congelaron a -20°C para determinación de amoníaco; 5 mL se congelaron inmediatamente a -20°C para determinación de ácidos grasos volátiles (AGV) y lactato.

-Muestras para el recuento de protozoos: Se tomaron 5 mL de líquido que se mezclaron con 5 mL de solución fijadora de los mismos (verde de

metilo y formaldehído 18,5%; Ogimoto e Imai, 1981). Las muestras se conservaron en la oscuridad y a temperatura ambiente hasta su recuento.

3.2.2 Muestras de contenido sólido

-Muestras para la extracción de ADN (100 g de sólido) y caracterización de la población microbiana: Estas muestras se congelaron a -80°C y posteriormente fueron liofilizadas.

-Muestras para determinar la actividad enzimática (10 g de sólido): Estas muestras se congelaron a -80°C hasta su análisis.

Una vez tomadas todas las muestras descritas anteriormente, se mezcló el líquido ruminal restante de las 4 ovejas y se utilizó para aislar un pellet LAB y el pellet de protozoos. Asimismo, se mezclaron los restos de contenido sólido de las 4 ovejas y la mezcla se utilizó para aislar un pellet SAB y el pellet de protozoos. El aislamiento de los pellets LAB y SAB se realizó siguiendo los procedimientos descritos en la primera prueba (Figura 3.1). Para el aislamiento del pellet de protozoos (ver Figura 3.2) se siguió el protocolo descrito por Williams y Coleman (1992). El sólido se mezcló con un volumen igual de solución de Coleman mezclado se volvió a filtrar y el filtrado resultante se mezcló con el líquido ruminal y con una cantidad igual de solución Coleman. A la mezcla se añadieron 5 gramos de glucosa y se dejó reposar en un embudo de decantación durante 1 hora a 39°C. Transcurrido este tiempo la capa inferior se separó (aproximadamente 50 mL) y fue filtrada por tela de nailon con un tamaño de poro de 200 µm y lavado con solución Coleman para eliminar restos vegetales. El filtrado fue lavado repetidamente con solución de Coleman sobre una tela de nailon con un tamaño de poro de 10 µm y filtrado para eliminar las bacterias adheridas a la superficie de los protozoos y finalmente se centrifugó a 6000 x g durante 5 min. Los pellets se congelaron a -80°C y fueron liofilizados antes de proceder a la extracción del ADN. Los pellets obtenidos en cada hora de muestreo y periodo experimental se mezclaron para obtener un único pellet de cada tipo (LAB, SAB y protozoos), cuyo DNA fue utilizado como estándar para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa (qPCR).

3.3 Procesado de las muestras y análisis químicos

3.3.1 Composición química

El contenido de MS se determinó mediante desecación a 100°C en una estufa de ventilación forzada hasta alcanzar un peso constante (AOAC, 1999). El contenido de cenizas se determinó por calcinación de las muestras

en un horno de mufla a 550°C y el contenido de materia orgánica (MO) se calculó por diferencia.

El contenido de FND y FAD se analizó siguiendo la técnica secuencial descrita por Van Soest *et al.* (1991), adoptando las modificaciones propuestas por ANKOM (1998). Para el análisis se utilizaron bolsas de poliéster (ANKOM Corp #57) con un tamaño de poro de 30 µm y unas dimensiones de 4,5 x 5,5 cm.

3.3.2 Parámetros ruminales

-El **pH** se determinó en el líquido inmediatamente tras el filtrado para separación de fases líquida y sólida utilizando un pH-metro Basic 20 (Crison Instruments, S.A. Alella, España).

-La concentración de **amoníaco** se determinó por el método colorimétrico descrito por Weatherburn (1967). Este método está basado en la reacción del amoníaco presente en la muestra con fenol e hipoclorito sódico, de tal forma que se produce indofenol. Este compuesto tiene color azul y la intensidad del color se determina en un espectrofotómetro. Para su análisis las muestras se descongelaron a 4°C y se centrifugaron (10 000 × g; 4°C; 15 min). El sobrenadante se diluyó con agua destilada hasta una concentración adecuada para el análisis. Un mL de esta dilución se mezcló con 5 mL de una solución de fenol y nitroprusiato sódico y 4 mL de una solución de hipoclorito sódico e hidróxido sódico, y se introdujo en un baño a 39°C durante 15 min. Transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm. Para la realización de la recta patrón se utilizó una solución de sulfato amónico 50 mM.

-La concentración de **AGV** se determinó mediante cromatografía de gases en un cromatógrafo Shimadzu GC 2010 equipado con un inyector automático, un detector de ionización de llama y una columna semicapilar TR-FFAP de 30 m x 0,53 mm x 1 µm (Supelco, Barcelona, España). Las muestras se descongelaron a 4°C y se centrifugaron a 16 000 × g durante 10 min a 4°C. A continuación se mezclaron 0,8 mL del sobrenadante con 0,5 mL de una solución acidificante y desproteinizante (ácido metafosfórico (1%) y ácido crotónico (0,2%) en ácido clorhídrico 0,5 M). La mezcla se dejó reposar 12 horas a 4°C y se volvió a centrifugar en las condiciones descritas anteriormente para trasvasarla a continuación a viales para su análisis en el cromatógrafo.

-La determinación de la concentración de **lactato** se realizó según la técnica descrita por Taylor (1996) que se basa en la reacción del ácido láctico presente en la muestra con parafenilfenol y sulfato de cobre en presencia de ácido sulfúrico y calor, produciéndose un compuesto que absorbe la luz a 570 nm. Las muestras se descongelaron a 4°C y se centrifugaron a 16 000 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se diluyó con agua destilada hasta una concentración adecuada para su análisis y 500 µL se mezclaron con 3 mL de ácido sulfúrico (96%). Se incubó a 100°C durante 10 min y, tras alcanzar la temperatura ambiente, se añadieron 50 µL de sulfato de cobre pentahidratado al 4%. Se agitó y se añadieron 100 µL de parafenilfenol al 1,5% disuelto en etanol al 95%. Tras agitar otra vez se incubaron a 30°C durante 60 min y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Ultrospec 500 pro, Amersham- Bioscience®, Barcelona, España). Para la realización de la curva patrón se utilizaron 5 soluciones de ácido láctico de concentración conocida.

3.3.3 Actividad enzimática

La actividad enzimática en las muestras se determinó siguiendo los procedimientos descritos por Giraldo *et al.* (2008). Las muestras de contenido sólido (aproximadamente 10 g) se descongelaron a 4°C. Una submuestra de 2 g se utilizó para determinar el contenido en MS y el resto fue picado con tijeras. A continuación, se pesaron 3 g en una bolsa de Stomacher® y se mezclaron con 15 mL de tampón fosfato (pH = 6,5) que contenía ditioneitol (DTT; 1mM). La mezcla fue homogeneizada en un Stomacher (Stomacher 400 Circulator, Seward Ltd., Londres, Reino Unido) a 230 rpm durante 5 min con el objetivo de desligar los microorganismos de las partículas de alimento. De la suspensión resultante se tomaron 1,5 mL que se trataron durante 3 min en un Mini-Beadbeater (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, Estados Unidos) para liberar las enzimas intracelulares. Tras el tratamiento las muestras se centrifugaron (10 000 x g; 10 min; 4°C) y en el sobrenadante se analizaron las actividades carboximetilcelulasa, avicelasa, xilanasas y amilasa usando como sustrato carboximetilcelulosa, Avicel®, xilano de avena y almidón soluble respectivamente. Las muestras de líquido ruminal se descongelaron también a 4°C y se tomaron 1,5 mL que se trataron en un Mini-Beadbeater y se analizaron siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. La actividad enzimática se expresó como micromoles de glucosa o xilosa liberados del sustrato correspondiente por g de MS de contenido sólido o mL de líquido ruminal en un minuto a pH 6,5 y 39°C.

3.3.4 Recuento de protozoos

Las muestras se agitaron suavemente y se contaron por duplicado en una cámara de recuento Hauser-Nageotte Bright Line (0,5 mm de profundidad; Hauser scientific, Horsham, PA, Estados Unidos) en 10 campos microscópicos y a 40 aumentos. Se identificaron las familias Isotrichidae y Ophryoscolecidae y, dentro de esta, las subfamilias Entodiniinae, Diplodiniinae y Ophryoscolecinae, siguiendo los procedimientos descritos por Dehority (1993). Cuando el coeficiente de variación entre muestras era mayor del 10% se contó una tercera muestra.

3.3.5 Extracción y cuantificación de ADN

El ADN se extrajo de las muestras siguiendo la técnica descrita por Yu y Morrison (2004) y en cada una de las pruebas se describe la cantidad de muestra utilizada. La lisis de las células se realizó en presencia de un tampón con sodio dodecil sulfato (4%), NaCl (500mM) y EDTA (50 mM). Este tampón además protege el ADN liberado de las células de la lisis por ADNasas, muy activas en el rumen. Las muestras, en presencia de esta solución se sometieron a dos tratamientos con un Mini-Beadbeater (BioSpec Products Inc., Bartlesville, OK, Estados Unidos). El resultado del tratamiento con el Mini-Beadbeater se sometió a un tratamiento con cloruro sódico y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para eliminar carbohidratos estructurales de los vegetales que podrían actuar como inhibidores de la PCR. Tras ello, los restos proteicos y restos del tampón se eliminaron mediante precipitación con acetato amónico para posteriormente recuperar los ácidos nucleicos mediante precipitación con isopropanol. A continuación, se inició el proceso de purificación del ADN a través de sucesivas digestiones enzimáticas con ribonucleasa y proteinasa K. Finalmente, el ADN se purificó con un kit QIAamp DNA stool Minikit (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos) obteniéndose 200 µL de eluato por muestra. El DNA eluído se cuantificó fluorométricamente usando un Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, DE, Estados Unidos) a una longitud de onda de 260 nm y su pureza se estimó a partir de la relación de absorbancias a 260 y 280 nm (A_{260}/A_{280}).

3.3.6 Análisis automatizado de la región espaciadora intergénica ribosomal (Automated ribosomal intergenic spacer analysis, ARISA)

El ADN extraído se amplificó usando los cebadores bacterianos universales 16S-1392f y 23S-123r (Danovaro *et al.*, 2006; sintetizados por Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España), que amplifican la región en el

operón ITS1 del ARNr. El cebador inverso fue marcado con el fluorocromo 6-FAM. Cada mezcla de PCR (25 μ L volumen final) contenía tampón de reacción de PCR 1x, $MgCl_2$ 1,5 mM, cada cebador 0,25 μ M, cada desoxinucleótido trifosfato en una concentración de 0,2 mM y 2,5 UI de Taq polimerasa (Biotools B&M Labs S.A., Madrid, España). La reacción se inició con un ciclo de desnaturalización inicial de 4 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 1 min a 94°C, anillamiento durante 1 min a 55°C y elongación a 72°C durante 2 min, con un paso final de extensión a 72°C durante 2 min.

Tabla 3.2: Secuencias de los cebadores para análisis automatizados de la región espaciadora intergénica ribosomal

| Primer | Secuencia | |
|------------|------------------------|-------------------------------|
| 16S-1392 f | 5'-GYACACACCGCCCGT-3' | Danovaro <i>et al.</i> , 2006 |
| 23S-125 r | 5'-GGGTTBCCCCATTCRG-3' | Danovaro <i>et al.</i> , 2006 |

Para cada muestra, 5 ng de amplicón se mezclaron con un estándar interno de tamaño (GS 1200 LIZ, Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) en formamida desionizada, después se desnaturalizaron a 94°C durante 4 min e inmediatamente se colocaron en hielo. La detección automática de los fragmentos del ARISA se llevó a cabo usando un secuenciador ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) con un capilar de 36 cm por 50 μ m y el polímero POP-7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Con el fin de incluir el máximo número de picos y estandarizar los electroferogramas, se utilizó un umbral de 100 unidades de fluorescencia. Se consideró que el perfil de los picos de los electroferogramas del ARISA reflejó las especies o comunidades bacterianas predominantes presentes en cada muestra, teniéndose en cuenta solamente la presencia o ausencia de picos. Se calculó el índice de diversidad de Shannon tal y como lo describen Shannon y Weaver (1949) para cada grupo de muestras y este índice fue utilizado para evaluar la diversidad de las comunidades bacterianas. Asimismo, se construyeron dendrogramas usando el coeficiente de correlación Pearson y la opción UPGMA (*Unweight pair-group method using arithmetic averages*) y se realizó un análisis de componentes principales utilizando el software MVSP v3.12d (Kovach Computing Service, Anglesey, Gales, Reino Unido).

3.3.7 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante. (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)

El ADN extraído se amplificó utilizando los cebadores GM5-clamp y 907r, que amplifican un fragmento del ADN ribosomal bacteriano de 550 pares de bases adecuado para la posterior realización de la DGGE. La PCR se realizó según el protocolo descrito por Muyzer *et al.* (2004). Cada reacción (25 μ L) contenía 2,5 μ L de buffer para PCR, 2 μ L de una mezcla de desoxinucleótidos (25 mM cada uno), 0,5 μ L de cada cebador (10 μ M) y 0,125 μ L de Taq polimerasa (5UI/ μ L; TAKARA Ex Taq, Takara Bio Inc, Shiga, Japón). El programa de amplificación, tras un paso de 5 min a 94°C, consistió en 31 ciclos, iniciándose todos ellos con una desnaturización a 94°C durante 1 min. La temperatura de anillamiento comenzó a 65°C durante 1 min y fue reduciéndose 0,5°C por ciclo hasta 55°C, temperatura a la que se mantuvo durante 10 ciclos. En todos los ciclos la extensión se realizó a 72°C durante 1 min. Por último se realizó un paso de extensión a 72°C durante 30 min. El producto de la PCR se diluyó 1:10 y se sometió a una PCR de reacondicionamiento para evitar la formación de heterodúplex (Thompson *et al.*, 2002) que podrían ser apreciados como bandas dobles en el gel tras la DGGE. Las reacciones de PCR estaban compuestas igual que en las anteriores. Las condiciones de esta PCR fueron 95°C durante 3 min y 3 ciclos de 95°C durante 1,5 min, 50°C durante 1 min y 72°C durante 2 min. Las PCR se realizaron en un termociclador 2720 (Applied Biosystem, Foster City, CA, Estados Unidos). El tamaño y calidad de los productos de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Tabla 3.3: Secuencias de los cebadores para la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante

| Primer | Secuencia | |
|-----------|----------------------------------|-----------------------------|
| GM5-clamp | 5'-GC clamp-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' | Muyzer <i>et al.</i> , 2004 |
| 907 r | 5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3' | Muyzer <i>et al.</i> , 2004 |

Diez μ L del producto de PCR se cargaron en un gel de acrilamida al 6% (que resuelve para fragmentos de 300 a 1000 pares de bases) con un gradiente desnaturizante de urea y formamida del 20% al 60%. El gel corrió durante 18 h a 100 voltios. Transcurridas las 18 h se tiñó con SYBR Gold y se consideró para el análisis la presencia o ausencia de bandas. Al igual que con los resultados del ARISA, se calculó el índice de diversidad de Shannon, se

construyeron dendrogramas y se realizó un análisis de componentes principales utilizando los procedimientos descritos anteriormente.

3.3.8 PCR cuantitativa (Quantitative PCR, qPCR)

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

Las PCR se realizaron usando Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) y se analizaron en un ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Las secuencias de los primers utilizados y la referencia bibliográfica en la que se describen se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4: Secuencias de los cebadores para la PCR cuantitativa

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

En todos los casos el volumen de reacción fue de 20 µL, que contenían 10 µL de SYBR Green PCR Master Mix, 0,9 µL de cada cebador (20 µM), 6,20 µL de agua milliQ y 2 µL de la muestra de ADN diluido 1:10. En el caso de las bacterias y los hongos las condiciones de la PCR fueron: un primer paso de 95°C durante 10 min y 40 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min.

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

Para la cuantificación absoluta de las bacterias totales se creó una curva patrón con estándares de ADN bacteriano de concentración conocida. Este ADN se obtuvo de los pellets de SAB (para el análisis del contenido sólido) o de LAB (para el análisis del fluido ruminal) obtenidos de las ovejas (Figura 3.1). Las diluciones en la curva patrón fueron de 10^{-1} a 10^{-5} . Las medidas de fluorescencia se registraron tras cada paso de extensión y el ciclo de cuantificación (el ciclo a partir del cual la fluorescencia del producto excede de la fluorescencia umbral) se registró durante la fase de amplificación exponencial. Este valor se relacionó con el logaritmo (base 10) de las concentraciones del estándar para calcular la cantidad de ADN bacteriano en la muestra. La cuantificación de las bacterias fibrolíticas y de los hongos se realizó de forma relativa en función de la cuantificación absoluta de las bacterias totales según el método propuesto por Pfaffl (2001).

En el caso de los protozoos las condiciones de la PCR fueron 94°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 54°C durante 30 s y 60°C durante 1 min.

La cuantificación absoluta se realizó de la misma forma que la descrita anteriormente para las bacterias. El ADN de protozoos para realizar la curva se extrajo del pellet protozoos aislado del rumen de las ovejas experimentales (Figura 3.2).

Figura 3.1: Proceso de obtención de los pellets de LAB y SAB

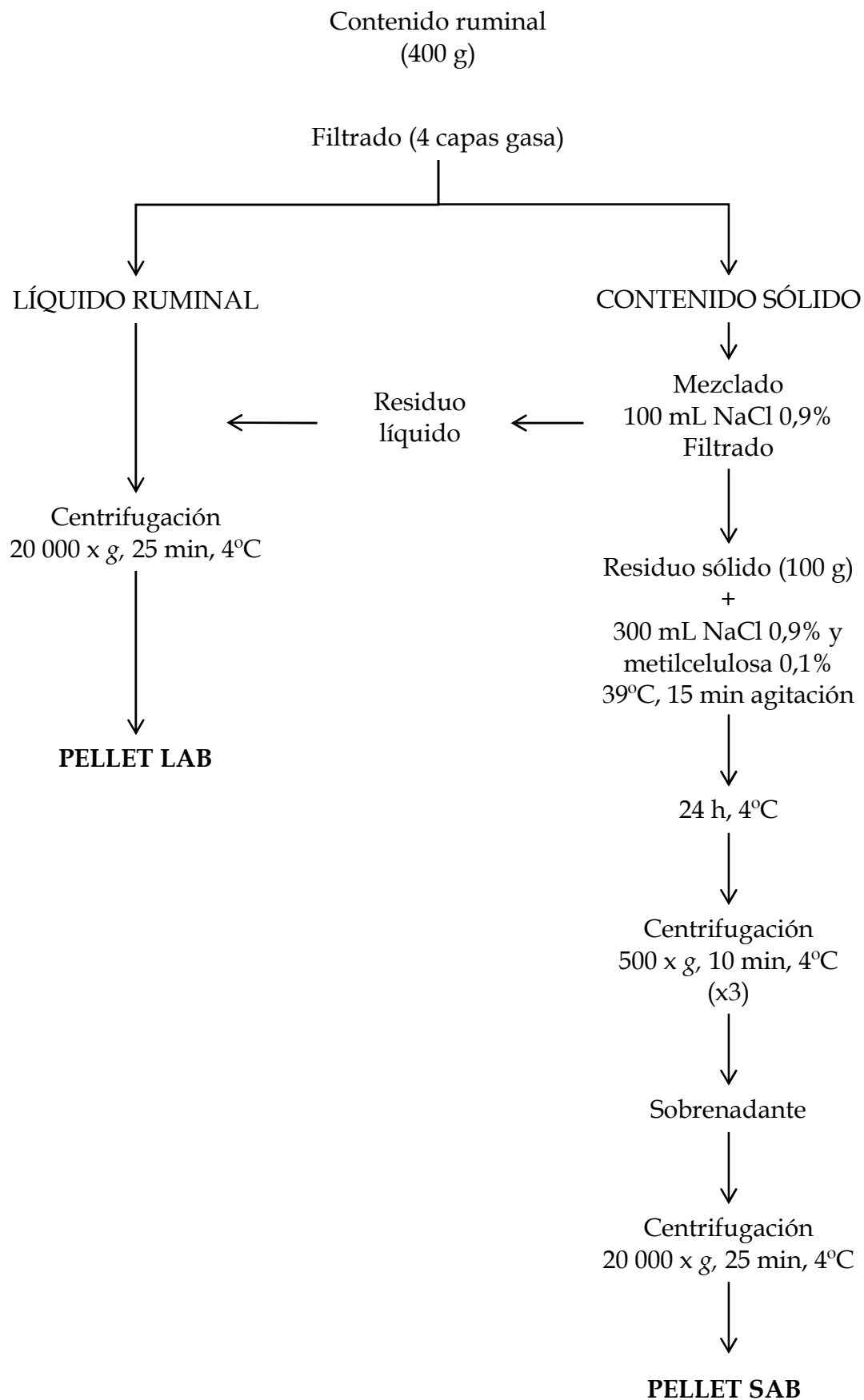
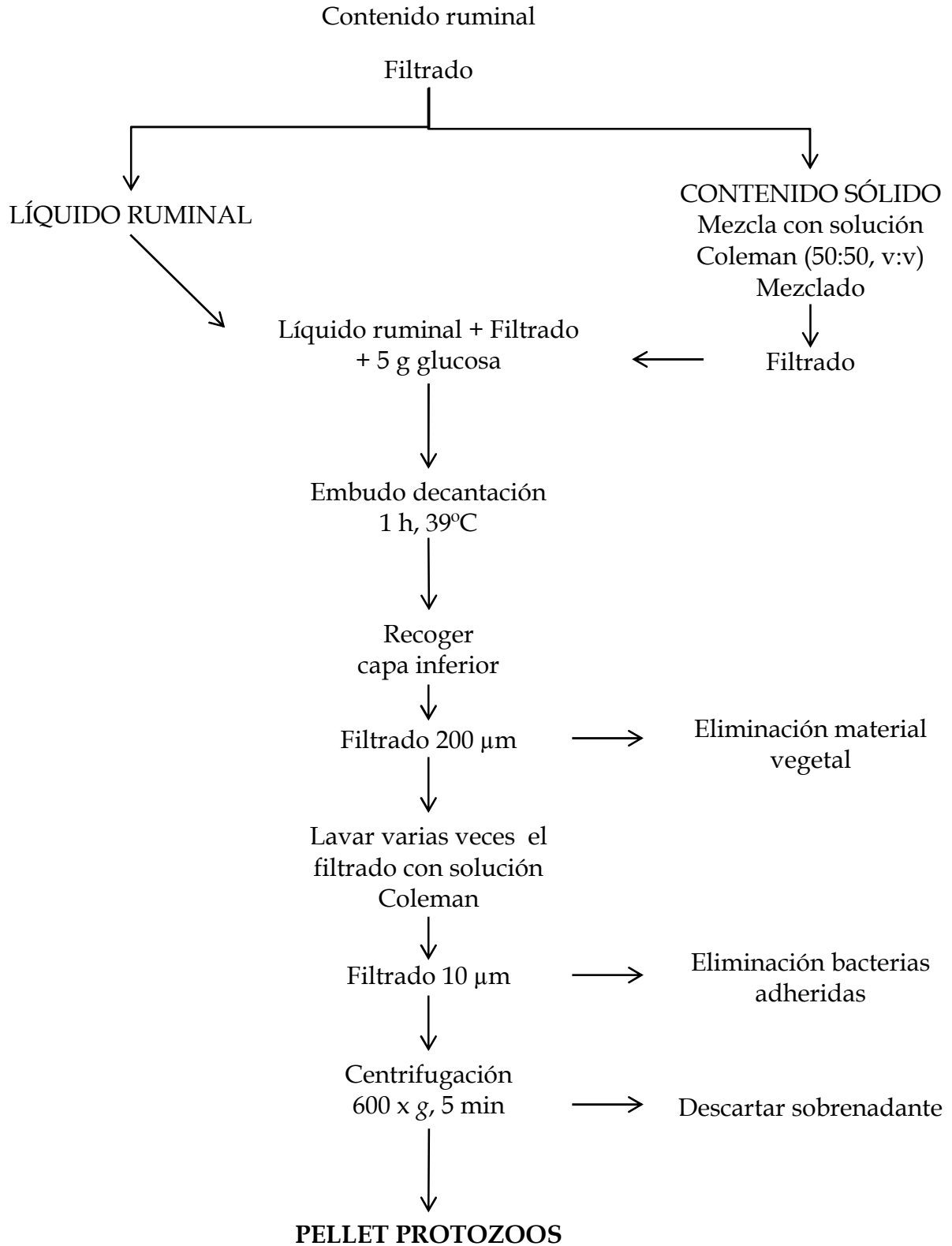


Figura 3.2: Proceso de obtención del pellet de protozoos



3.4 Referencias bibliográficas

- ANKOM. 1998. Procedures for fibre and *in vitro* analysis. <http://www.ankom.com>. Consultado el 26/03/2008.
- AOAC. 1999. *Official methods of analysis*. Association of Official Analytical Chemists, ed. Gaithersburg, Madison, EEUU.
- Danovaro, R., G. M. Luna, A. Dell'Anno, B. Pietrangeli. 2006. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5982-5989.
- Dehority, B. A. 1993. *Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, EEUU.
- Denman, S. E., C. S. McSweeney. 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., N. W. Tomkins, C. S. McSweeney. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 313-322.
- Giraldo, L. A., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, M. D. Carro. 2008. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141: 306-325.
- Koike, S., Y. Kobayashi. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 361-366.
- Komarek, R. J. 1981. Rumen and abomasal cannulation of sheep with specially designed cannulas and a cannula insertion instrument. *J. Anim. Sci.* 53: 790-795.
- Muyzer, G., T. Brinkhoff, U. Nübel, C. Santegoeds, H. Schäfer., C. Wawer. 2004. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology, en: *Molecular microbial ecology manual*. Kowalchuk, G. A., F. J. de Bruijn, I. M. Head, A. D. Akkermans, J. D. van Elsas, ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Ogimoto, K., S. Imain. 1981. *Atlas of rumen microbiology*. Japan Society Press, Japón.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* 29: e45.
- Ramos, S., M. L. Tejido, M. E. Martinez, M. J. Ranilla, M. D. Carro. 2009. Microbial protein synthesis, ruminal digestion, microbial populations, and nitrogen balance in sheep fed diets varying in forage-to-concentrate ratio and type of forage. *J. Anim. Sci.* 87: 2924-2934.
- Shannon, C. E., W. Weaver. 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana, Illinois, EEUU.

- Sylvester, J. T., S. K. R. Karnati, Z. Yu, M. Morrison, J. L. Firkins. 2004. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. *J. Nutrit.* 134: 3378-3384.
- Taylor, K. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56: 49-58.
- Thompson, J. R., L. A. Marcelino, M. F. Polz. 2002. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: Formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucl. Acids Res.* 30: 2083-2088.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39: 971-974.
- Williams, A. G., G. S. Coleman. 1992. *The rumen protozoa*. Springer-Verlag, Nueva York, EEUU.
- Yu, Z., M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques.* 36: 808-812.

CAPÍTULO 4
PRUEBAS EXPERIMENTALES

4.1 PRUEBA 1

DIVERSITY OF BACTERIAL COMMUNITIES ISOLATED FROM THE SOLID AND LIQUID PHASE OF THE RUMEN OF SHEEP FED DIETS OF VARIABLE COMPOSITION

**DIVERSITY OF BACTERIAL COMMUNITIES ISOLATED
FROM THE SOLID AND LIQUID PHASE OF THE RUMEN OF
SHEEP FED DIETS OF VARIABLE COMPOSITION**

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

Departamento de Producción Animal, Universidad de León, 24071 León,
Spain

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

Options Méditerranéennes, A no. 99: 169-174

Diversity of bacterial communities isolated from the solid and liquid phase of the rumen of sheep fed diets of variable composition

The aim of this study was to analyze bacterial diversity in bacterial pellets isolated from the solid (SAB) and liquid (LAB) phase of the rumen in sheep fed different diets. Four rumen-fistulated sheep were fed 4 diets with forage:concentrate ratios (F:C) of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and either alfalfa hay or grass hay as forage (FOR). SAB and LAB were isolated from each sheep immediately before feeding, and the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) of the 16S ribosomal DNA was used to analyze bacterial diversity. A total of 168 peaks were detected in the ARISA electropherograms across the total 32 bacterial pellets, with 6 peaks only found in SAB and 8 found only in LAB. The SAB isolated from sheep fed HF diets had greater number of peaks and Shannon index than those from sheep fed HC diets ($P=0.03$ and 0.05 , respectively), and SAB from sheep fed grass hay diets had greater values of both parameters than those isolated from sheep receiving alfalfa hay diets ($P=0.002$ and 0.004). In contrast, LAB profile was not affected ($P=0.23$ to 0.65) by either F:C ratio or FOR. The results indicate that SAB are more markedly affected by dietary characteristics than LAB.

Key words: bacterial diversity, ARISA, forage, rumen, sheep

Diversité bactérienne des communautés isolées dans la phase solide et liquide du rumen de moutons recevant des régimes de composition variable

L'objectif de ce travail a été d'analyser la diversité bactérienne des pellets isolés à partir de la phase solide (SAB) et la phase liquide (LAB) du rumen chez les moutons alimentés avec deux régimes différents. Quatre moutons munis de canules ruminales ont été utilisées dans un schéma en carré latin incomplet. Les quatre régimes expérimentaux avaient des rapports fourrage:concentré 70:30 (HF) ou 30:70 (HC), étant le fourrage soit le foin de luzerne (A) soit le foin d'herbe (G). SAB et LAB ont été isolés dans chaque mouton juste avant la prise d'aliment, et la diversité bactérienne a été caractérisé par ARISA (automated ribosomal intergenic spacer analysis). Un total de 168 pics ont été détectées dans les électrophérogrammes d'ARISA des 32 pellets bactériens, avec 6 pics seulement trouvées dans les SAB et 8 trouvés seulement dans les LAB. Les pellets SAB isolés chez les moutons recevant les régimes HF ont eu un plus grand nombre de pics et un index de Shannon plus élevé que ceux des régimes HC ($P=0.03$ et 0.05 , respectivement), et les pellets SAB isolés chez les moutons recevant le foin d'herbe ont eu des valeurs plus élevés pour les deux paramètres que ceux isolés chez des moutons recevant du foin de luzerne ($P=0.002$ et 0.004). En revanche, le profil des pellets LAB n'a pas été affecté ($P=0.23$ à 0.65) par les rapports fourrage:concentré ou par le type de fourrage. Les résultats indiquent que les pellets SAB sont plus nettement affectés par les caractéristiques du régime alimentaire que les pellets LAB.

Mots-clés: diversité bactérienne, ARISA, fourrage, rumen, mouton

4.1.1 Introduction

The rumen is an anaerobic microbial ecosystem which is inhabited by a complex microbial population including bacteria, protozoa, fungi and archaea. Differences in chemical composition and metabolic functions between bacteria isolated from the liquid (LAB) and solid (SAB) phase of the rumen are widely demonstrated (Merry and McAllan, 1983; Ipharraguerre *et al.*, 2007), but the differences between LAB and SAB in the bacterial communities have received relatively little attention. An additional problem is that the total composition of bacterial communities in the rumen cannot be studied with traditional cultivation techniques. In the last years, different molecular fingerprinting techniques have been used to assess the richness and/or diversity of ruminal microbial communities (Kocherginskaya *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2009; Welkie *et al.*, 2010). The purpose of this study was to analyze the bacterial diversity in LAB and SAB isolated from sheep fed different diets, through the use of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA), a community fingerprinting technique that allows profiling of the culturable and currently unculturable residents of a microbial habitat (Welkie *et al.*, 2010). The ARISA analysis was selected because it is a rapid and effective method for assessing microbial community diversity (Fisher and Triplett, 1999) and it allows a fast analysis of a large number of samples.

4.1.2 Materials and methods

Four rumen-cannulated merino sheep (58.5 ± 3.16 kg body weight) were used. Sheep were housed in individual pens, had continuous access to fresh water and vitamin/mineral block over the experimental period and were cared and handled in accordance with the Spanish Animal Care Regulations. The four experimental diets had forage:concentrate (F:C) ratios (dry matter (DM) basis) of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) with either alfalfa hay (HFA and HCA) or grass hay (HFG and HCG) as forage. The concentrate was based on barley, gluten feed, wheat middlings, soybean meal, palmkern meal, wheat, corn and mineral-vitamin premix (215, 204, 200, 135, 115, 50, 50 and 31 g/kg, respectively; fresh matter basis). Crude protein content was 186, 177, 121 and 160 g/kg DM for HFA, HCA, HFG and HCG, respectively, and neutral-detergent fibre content was 426, 374, 499 and 401 g/kg DM. Diets were offered to the animals twice daily (08:00 and 20:00 h) at a daily rate of 52 g DM/kg body weight^{0.75} to minimise feed selection.

The experimental design was a 4 x 4 Latin square, with 21 d of dietary adaptation in each experimental period. On d 22 of each period, about 400 g of ruminal contents were taken through the cannula of each sheep immediately before the morning feeding and strained through 4 layers of cheesecloth. The solid digesta was combined with 100 mL of saline solution (0.9% NaCl) at 38°C, mixed gently, and squeezed again to remove residual LAB. The procedure was repeated and the solution added to the ruminal fluid before isolation of LAB by differential centrifugation (Ranilla and Carro, 2003). The solid digesta (100 g) was incubated with saline solution (0.9% NaCl; 3 mL per g of digesta) containing 0.1% methylcellulose at 38°C for 15 min in a continuous-shaking water bath (65 strokes per min); then 50 mL of cold (4°C) saline solution containing 0.1% methylcellulose were added, and the material was stored at 4°C for 24 h. The samples were homogenized for 10 s with a Waring Blender, centrifuged at 500 x g for 10 min at 4°C, and the supernatant fraction was removed and retained. The solids were resuspended two times in saline solution containing 0.1% methylcellulose, and then recentrifuged (500 x g for 10 min at 4°C). The final filtrates were then centrifuged at 20 000 x g for 25 min at 4°C to isolate SAB. The pellets were washed by resuspension in saline solution, and the centrifugation was repeated. Bacterial pellets were freeze-dried and analyzed for bacterial diversity by ARISA.

DNA was isolated from bacterial pellets (30 mg of DM) as described by Yu and Morrison (2004). Extracted DNA was amplified using universal bacterial primers 16S-1392F and 23S-125R (Danovaro *et al.*, 2006; synthesized by Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, Spain), which amplify the ITS1 region in the rRNA operon plus ca. 282 bases of the 16S and 23S sRNA. Primer 23S-125R was fluorescently labelled with the phosphoramidite dye 6-FAM. Each PCR mix (50 µL final volume) contained 1 x PCR reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 µM of each primer, each deoxynucleotide triphosphate at a concentration of 0.2 mM, and 2.5 U of Taq Polymerase (Biotools B&M Labs SA, Madrid, Spain). Thermocycling was conducted in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), and started with an initial cycle of denaturation (94°C for 3 min), followed by 30 cycles of denaturation (94°C for 60 s), annealing (55°C for 60 s) and elongation (72°C for 120 s), ending with a final extension step at 72°C for 2 min. The PCR products were analyzed for size and quantity by electrophoresis in 1.5% agarose gels, and further purified using a Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Eluted

DNA was quantified fluorimetrically using a Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Delaware, USA). For each ARISA, about 5 ng of amplicons were mixed with an internal size standard (GS 1200 LIZ, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in deionized formamide, then denatured at 94°C for 2 min, and immediately chilled on ice. Automated detection of ARISA fragments was carried out using an ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with 36-cm by 50- μ m capillary and POP-7 polymer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Peak size and area were estimated by comparison with the internal size standard using the GeneMaker Software v1.80 (SoftGenetics, State College, PA, USA). To include the maximum number of peaks while excluding background fluorescence, a threshold of 100 fluorescence units was used.

It was considered that the peak profile in ARISA electropherograms reflects the predominant bacterial species or populations present in the bacterial pellets, and only the presence/absence of the different peaks was considered for the analysis. The Shannon diversity index was calculated as described by Shannon and Weaver (1949). To analyze the similarity between LAB and SAB, a percent similarity index was calculated from the peak profile patterns in the electropherograms of both types of bacteria isolated from each sheep within dietary treatment. Dendrograms were constructed using the Pearson product-moment correlation coefficient and unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) options in the MVSP v3.12d software (Kovach Computing Service, Anglesey, Wales, UK), and principal component analysis (PCA) was performed using the MVSP v3.12d software.

Data were analyzed using the MIXED procedure (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). The effects of F:C ratio, type of forage (FOR), period, and the interaction F:C \times FOR were considered fixed, and sheep effect was considered random.

4.1.3 Results and discussion

The number of peaks in bacterial pellets isolated from sheep rumen ranged from 42 to 82 for LAB and from 31 to 81 for SAB, with a total of 168 different peaks. There were 8 peaks only found in LAB (4.8% of detected) and 6 appeared only in SAB (3.6% of detected). In a study using ARISA to analyze the ruminal bacterial community in 2 lactating cows fed a 65% forage diet, Welkie *et al.* (2010) observed that 13.5% of the peaks were

detected only in the liquid phase, and 1.9% were detected only in the solid phase.

As shown in Table 4.1.1, no interaction ($P=0.28$ to 0.96) F:C x FOR was observed for any variable. Both the number of peaks and the Shannon index were greater in SAB isolated from sheep fed HF diets than from those fed HC diets ($P=0.03$ and 0.05 , respectively), but no effect of F:C ratio was detected on LAB ($P=0.39$ and 0.23 , respectively). The results are in accordance with those reported by Laure *et al.* (2005), who observed that bacterial diversity in SAB tended to be greater in sheep fed only orchardgrass hay compared with those fed a 70:30 orchardgrass:concentrate diet. In contrast, Kocherginskaya *et al.* (2001) found that corn-fed steers displayed more diverse and rich bacterial populations in the ruminal liquid phase than hay-fed steers.

Table 4.1.1: Values of Shannon index and numbers of peaks detected in the ARISA electropherograms of liquid-associated (LAB) and solid-associated (SAB) bacterial pellets isolated from the rumen of sheep receiving diets differing in forage:concentrate ratio (F:C) and type of forage (FOR), and similarity index (%) of ARISA profiles between LAB and SAB pellets

| Item | Diet ¹ | | | | SEM | Significance of effects ($P=$) | | |
|------------------|-------------------|------|------|------|-------|-------------------------------------|-------|-----------|
| | HFA | HFG | HCA | HCG | | F:C | FOR | F:C x FOR |
| Number of peaks | | | | | | | | |
| LAB | 65.0 | 63.8 | 62.0 | 59.5 | 3.80 | 0.39 | 0.65 | 0.86 |
| SAB | 54.5 | 77.5 | 48.5 | 63.0 | 3.57 | 0.03 | 0.002 | 0.28 |
| Shannon index | | | | | | | | |
| LAB | 4.17 | 4.13 | 4.09 | 4.05 | 0.063 | 0.23 | 0.54 | 0.96 |
| SAB | 3.95 | 4.34 | 3.88 | 4.12 | 0.071 | 0.05 | 0.004 | 0.29 |
| Similarity index | 56.5 | 50.7 | 51.7 | 54.1 | 5.46 | 0.90 | 0.76 | 0.48 |

¹ HFA: 70:30 alfalfa hay:concentrate; HFG: 70:30 grass hay:concentrate; HCA: 30:70 alfalfa hay:concentrate; HCG: 30:70 grass hay:concentrate. Dry matter basis.

Whereas FOR had no effect ($P>0.05$) on LAB profile, SAB isolated from sheep receiving grass hay diets had greater number of peaks and Shannon index values than those isolated when alfalfa hay diets were fed ($P<0.001$ to 0.004). This is in agreement with the results of Koike *et al.* (2003), who observed that the set of bacteria isolated from orchardgrass seemed to be different from the set isolated from alfalfa when samples of both forages were incubated *in sacco* in the rumen of sheep and bacterial 16S rDNAs were cloned. These authors concluded that the hay source may affect the members

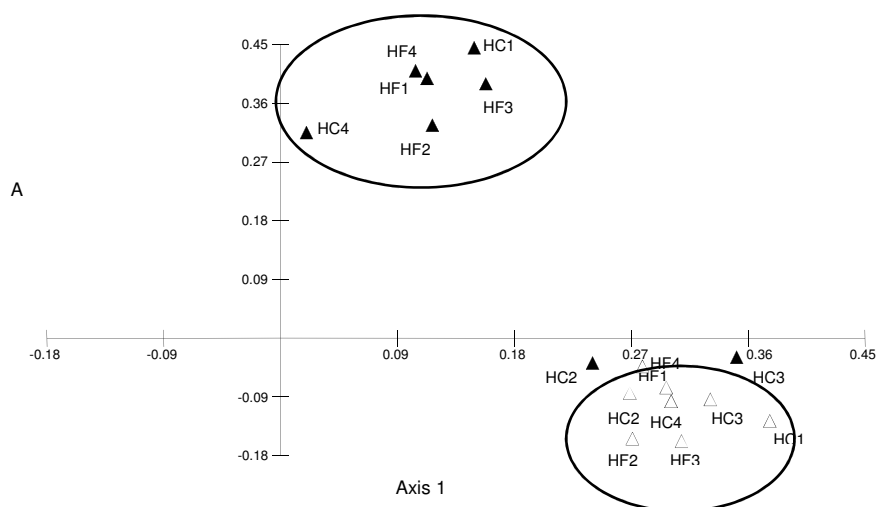
of fibre-associated rumen bacterial community, which is in agreement with our results.

The similarity index between LAB and SAB ranged from 37.8 to 74.3% (individual values not shown), and was not affected by diet characteristics ($P=0.90$ and 0.76 for F:C and FOR, respectively; Table 4.1.1). In addition, there was no relationship ($r=0.098$; $P=0.72$; $n=16$) between the number of peaks in LAB and that in SAB. In accordance with our results, Larue *et al.* (2005) and Michalet-Doreau *et al.* (2001) reported differences in the bacterial communities found in the fluid and those in the solid phase of sheep rumen. It must be noticed that whereas LAB are relatively easy to isolate, and a great recovery of the bacteria populations should be expected, recovery of SAB from ruminal digesta is usually low, indicating that a pure SAB isolate may not be representative of the total SAB population. The treatment of sheep ruminal digesta with the detachment method used in the present study has been reported to recover about 37 and 29% for HF and HC diets (Ramos *et al.*, 2009).

Several studies have pointed out large variations of microbial communities between animals (Mackie *et al.*, 1999; Firkins and Yu, 2006). In order to reduce the inter-animal variability in our study, we decided to use a 4 x 4 Latin square design. Significant effects of sheep were found on the number of peaks and Shannon index of LAB ($P=0.008$ and 0.005 , respectively) and SAB ($P=0.02$ and 0.02), confirming previous observations. Bacterial communities in the gastrointestinal tract are influenced by numerous internal host-related factors, such as mastication, rumia, feeding behavior, digesta passage rate, etc.

The dendrograms of the ARISA profiles of LAB showed no clear clustering pattern based on F:C ratio or FOR (dendrograms not shown). In contrast, SAB pellets formed two major clusters according to FOR, with all pellets from sheep fed alfalfa hay diets clustered together and the majority of SAB pellets from grass hay-fed sheep grouped in a different cluster. This was confirmed in the PCA analyses (Figure 4.1.1). There was not a clear separation between LAB obtained from sheep fed HF and HC diets, or between diets with alfalfa hay and grass hay (Figure 4.1.1A). In contrast, the PCA analysis of SAB clearly discriminated between alfalfa and grass hay diets, and all SAB from sheep fed alfalfa hay diets grouped together whereas most samples from grass hay-fed sheep formed a distinct group (Figure 4.1.1B).

A)



B)

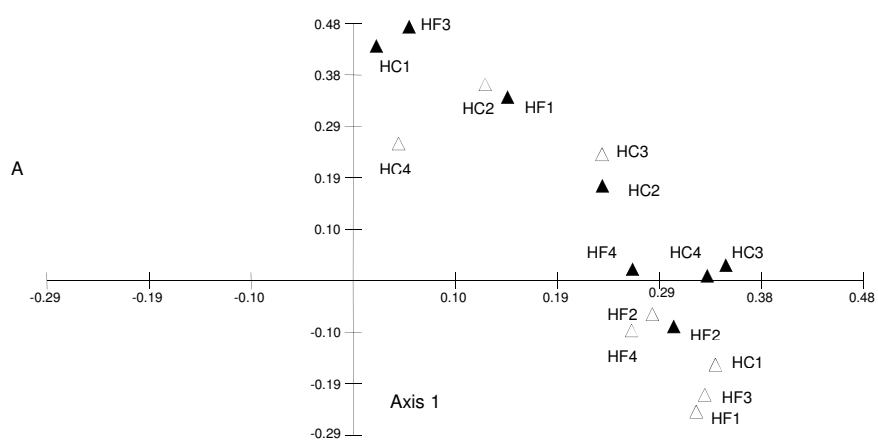


Figure 4.1.1: Principal component analysis generated from ARISA profiles of liquid-associated (A) and solid-associated (B) bacteria isolated from sheep fed diets containing alfalfa hay (Δ) or grass hay (\blacktriangle). Sheep received diets with F:C ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and alfalfa hay or grass hay as forage. Numbers 1 to 4 correspond to individual sheep

4.1.4 Conclusions

Bacterial diversity in SAB pellets was affected by both the type of forage and forage to concentrate ratio in the diet, whereas the structure of LAB communities seemed to be independent of diet characteristics. The similarity index between LAB and SAB ranged from 50.7 to 56.5% and was not affected by the diet. The results indicate that bacteria in the solid phase of the rumen are more markedly affected by dietary characteristics than those in the liquid phase.

Acknowledgements: The authors wish to acknowledge the financial support received from the MCYT of Spain (project AGL2004-04755-C02-01) and the Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (Ref. GR158). C. Saro gratefully acknowledges the receipt of a scholarship from the MEC of Spain (AP 2006-03049).

4.1.5 Literature cited

- Danovaro, R., G. M. Luna, A. Dell'Anno, B. Pietrangeli. 2006. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5982-5989.
- Firkins, J. L., Z. Yu. 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*. Serjzen, K., T. Hevelplund, M. O. Nielsen, ed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Neatherlands.
- Fisher, M. M., E. W. Triplett. 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environm. Microbiol.* 65: 4630 - 4636.
- Ipharraguerre, I. R., S. M. Reynal, M. Liñeiro, G. A. Broderick, J. H. Clark. 2007. A comparison of sampling sites, digesta and microbial markers, and microbial references for assessing the postruminal supply of nutrients in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 1904-1919.
- Kocherginskaya, S. A., R. I. Aminov, B. A. White. 2001. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe.* 7: 119-134.
- Koike S, J. Pan, Y. Kobayashi, K. Tanaka. 2003. Kinetics of fiber attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *J. Dairy Sci.* 86: 1429 -1435.
- Larue, R., Z. Yu, V. A. Parisi, A. R. Egan, M. Morrison. 2005. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and *rrs* gene sequencing. *Environ. Microbiol.* 74: 530-543.

- Mackie, R. I., A. Sghir, H. R. Gaskins. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 1035S-45S.
- Merry, R. J., A. B. McAllan. 1983. A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta. *Br. J. Nutr.* 5: 701-709.
- Michalet-Doreau, B., I. Fernandez, C. Peyron, L. Millet, G. Fonty. 2001. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod. Nutr. Dev.* 41: 187-194.
- Ramos, S., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, M. E. Martínez, C. Saro, M. D. Carro. 2009. Influence of detachment procedure and diet on recovery of solid-associated bacteria from sheep ruminal digesta and representativeness of bacterial isolates as assessed by automated ribosomal intergenic spacer analysis-polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* 92: 5659-5668.
- Ranilla, M. J., M. D. Carro. 2003. Diet and procedures to detach particle-associated microbes from ruminal digesta influence chemical composition of microbes and estimation of microbial growth in Rusitec fermenters. *J. Anim. Sci.* 81: 537-544.
- Shannon, C. E., W. Weaver. 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana, Illinois, USA.
- Welkie, D. G., D. M. Stevenson, P. J. Weimer. 2010. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe*. 16(2): 94-100.
- Yu, Z., M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques*. 36: 808-812.

4.2 PRUEBA 2

**POSTPRANDIAL CHANGES OF FIBER-DEGRADING
MICROBES IN THE RUMEN OF SHEEP FED DIETS
VARYING IN TYPE OF FORAGE AS MONITORED BY
REAL-TIME PCR AND ARISA**

**POSTPRANDIAL CHANGES OF FIBER-DEGRADING
MICROBES IN THE RUMEN OF SHEEP FED DIETS
VARYING IN TYPE OF FORAGE AS MONITORED BY
REAL-TIME PCR AND ARISA**

C. Saro, M. J. Ranilla and M. D. Carro

Departamento de Producción Animal, Universidad de León, 24071

León (Spain)

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

Grulleros, León (Spain)

Journal of Animal Science (en evaluación)

Postprandial evolution of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets varying as monitored by real-time PCR and ARISA

Four ruminally cannulated sheep were used in a cross-over design to assess the postprandial changes of fiber-degrading microbes in the solid-phase of the rumen of sheep fed two high-forage diets. The diets had forage:concentrate ratio of 70:30 (DM basis) and either alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as forage (FOR). Sheep were fed twice daily, and samples from solid rumen digesta were taken at 0, 4 and 8 h after the morning feeding. Postprandial changes of DNA concentrations of all determined microbial populations were similar for the two diets. Samples taken at 4 h post-feeding had lower ($P<0.05$) concentrations of total bacterial DNA determined by real time PCR and bacterial diversity, and greater ($P<0.05$) protozoal DNA concentrations, relative abundance of fungal, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* and *Ruminococcus albus* DNA compared with those taken at 0 and 8 h. No effect ($P=0.41$ to 0.76) of FOR was detected either on concentrations of bacterial and protozoal DNA or the relative abundance of the two *Ruminococcus* DNA, but GR diet promoted greater ($P<0.001$) relative abundance of *F. succinogenes* and fungal DNA compared with AL diet. *F. succinogenes* was the most abundant ($P<0.05$) of the three cellulolytic bacteria for both diets, with no differences ($P<0.05$) between the two *Ruminococcus* species. Rumen pH and carboxymethylcellulase, Avicelase and amylase activities were not affected ($P=0.15$ to 0.69) by FOR, but xylanase activity was greater ($P=0.01$) for GR diet. No correlations ($P=0.08$ to 0.97) were found between any enzymatic activities and DNA concentrations of protozoa, fungi and cellulolytic bacteria. The influence of FOR on microbial communities in ruminal solid digesta was more evident in the first hours after feeding than at longer post-feeding periods, which highlights the influence of sampling time when investigating dietary effects on rumen function and microbial populations.

Key words: cellulolytic bacteria, fungi, protozoa, real time PCR, sheep

4.2.1 Introduction

The rumen is one of the most-studied gastrointestinal systems, but the majority of ruminal microbes have not yet been isolated and characterized, thus limiting our understanding of ruminal microbial ecology. Culture-independent methods, most of them based on amplification of specific DNA fragments using PCR, have recently enabled identification of new microbial taxonomic groups, as well as characterization of microbial community structures. Ruminal microbial populations are affected by a wide range of factors, with the diet fed to the host animal being one of the most relevant (Dehority and Orpin, 1997). Several studies have analyzed the changes in microbial population density when animals are switched from forage-based to high-concentrate diets (Kocherginskaya *et al.*, 2001; Tajima *et al.*, 2001; Wanapat and Cherdthong, 2009; Julien *et al.*, 2010), but there is little information on the influence of the type of forage (FOR) in the diet on ruminal populations, and it is limited to cattle. Forage digestion is achieved largely by a mixed population of bacteria, protozoa and fungi, and the solid attached microbes play a major role in fiber digestion in terms of mass and fibrolytic activity (Michalet-Doreau *et al.*, 2001). To our knowledge only a few studies have investigated the relationships between the fibrolytic activity of solid ruminal digesta and the abundance of microbes with fibrolytic activity. *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* and *Ruminococcus albus* are the 3 species of cellulolytic bacteria of general concern when considering fiber digestion, and some studies have investigated the effects of dietary composition on their population in cows (Martin *et al.*, 2001; Tajima *et al.*, 2001), sheep (Koike and Kobayashi, 2001; Michalet-Doreau *et al.*, 2001, 2002; Koike *et al.*, 2003; Mosoni *et al.*, 2007), and swamp buffalo rumen (Wanapat and Cherdthong, 2009), but other microbial populations with fibrolytic activity, such as protozoa and fungi, have received less attention.

The aim of this study was to assess by quantitative PCR (qPCR) the postprandial changes of fiber-degrading microbes in the solid ruminal digesta of sheep fed two high-forage diets, and to investigate their relationships with the fibrolytic activity. In addition, variations in bacterial diversity during the feeding cycle were investigated by automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA).

4.2.2 Materials and methods

4.2.2.1 Animals and diets

Four ruminally-cannulated merino sheep (58.3 ± 3.27 kg BW) were used in a cross-over design. Sheep were housed in individual pens and had continuous access to fresh water and vitamin/mineral block over the trial. Sheep were cared for and handled in accordance with the Spanish Animal Care Regulations, and the experimental protocols were approved by the León University Institutional Animal Care and Use Committee. Two total mixed diets were formulated following NRC (2007) guidelines. The experimental diets contained (DM basis) 30% of concentrate and 70% of either alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as forage source, and their chemical composition is shown in Table 4.2.1. The concentrate was based on barley, gluten feed, wheat middlings, soybean meal, palm kernel meal, wheat, corn and mineral/vitamin premix in the proportions of 217, 204, 197, 134, 115, 50, 50 and 33 g/kg, respectively (DM basis), and contained 91.4% DM, 3.04% N, 33.5% NDF, 12.5% ADF, 2.5% ether extract and 27.9% starch (DM basis). The alfalfa hay was a second-cut harvested at 30% flowering, and it contained 91.3% DM, 2.67% N, 46.6% NDF, 33.1% ADF and 1.79% ether extract (DM basis). The grass hay consisted primarily of perennial ryegrass (81%), red and white clover (11%) and other grasses (8%), it was harvested at post-flowering stage, and it contained 93.3% DM, 1.46% N, 56.9% NDF, 28.6% ADF and 1.68% ether extract (DM basis).

Table 4.2.1: Chemical composition of the experimental diets containing 70% of alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as forage and 30% of concentrate (DM basis)

| Item | AL | GR |
|---------------------------------|------|------|
| DM, % | 92.7 | 92.5 |
| OM, % of DM | 91.3 | 92.7 |
| N, % of DM | 2.69 | 1.94 |
| NDF, % of DM | 42.6 | 49.9 |
| ADF, % of DM | 26.9 | 23.8 |
| Ether extract, % of DM | 2.02 | 1.90 |
| NSC ¹ , % of DM | 29.9 | 28.8 |
| ME ² , Mcal/kg of DM | 2.12 | 2.00 |

¹ Non-fiber carbohydrates; calculated as $100 - (\text{crude protein} + \text{ash} + \text{NDF} + \text{ether extract})$. Crude protein was calculated as $\text{N} \times 6.25$.

² Estimated according to the NRC (2007).

Diets were offered to the animals twice daily (08:00 and 20:00 h) at a daily rate of 52 g DM/kg BW^{0.75} to minimize feed selection. This level of intake was estimated to meet 1.2 and 1.1 times the energy maintenance requirements of the experimental sheep for AL and GR diets, respectively (NRC, 2007). Sheep consumed all the diet offered, with the exception of one sheep that occasionally left some refusals (< 100 g/d) with diet GR.

4.2.2.2 Experimental procedure and sampling

Each of the two 24-day experimental periods consisted of 21 days of dietary adaptation and 3 days for sample collection. Samples of offered diets were collected daily, composited and dried at 55°C in an oven for 48 h and ground using a Culatti grinder (model DFH 48, Culatti, Zurich, Switzerland) with a 1-mm screen before chemical analyses.

On d 22 and 24 of each period, ruminal content from each sheep was sampled immediately before the morning feeding (0 h) and at 4 and 8 h after feeding. Samples (mix of liquid and solid) from the dorsal, central and ventral regions of the rumen were collected with a pair of tongs inserted through the rumen cannula to form one composited sample (about 500 g) for each sheep at each sampling time. Ruminal content was strained through 2 layers of cheesecloth, the pH of the fluid was immediately measured (Crison pH Meter Basic 20, Barcelona, Spain), and the solid content was thoroughly mixed before sampling. About 100 g were placed in sterile containers and stored frozen at -80°C until DNA extraction. Ten g of solid content were immediately frozen at -80°C for determination of carboxymethylcellulase (CMCase), Avicelase, xylanase, and amylase activities. Finally, 20 g were weighed, and dried at 55°C in an oven until constant weight to determine DM content of the solid phase. Within each experimental period and sampling time, the 2 samples taken on the 2 sampling days for each sheep were composited (3 samples per sheep in each period) before analysis. Within each period there were 3 samples per sheep (one for each sampling time) for enzymatic activity and qPCR analyses.

Additionally, pellets of bacteria and protozoa were isolated to obtain bacterial and protozoal DNA to be used as standard for qPCR analysis. At each sampling time, the remaining solid contents of each sheep were mixed to one pooled sample, which was divided into two similar fractions for bacterial and protozoal pellets isolation. One half was combined with an equal volume of saline solution (0.9% NaCl; 38°C), mixed gently and squeezed again to remove residual non-attached bacteria. The solid digesta

was then incubated with saline solution containing 0.1% methylcellulose at 38°C for 15 min in a continuous-shaking water bath to detach solid-associated bacteria (SAB). The SAB pellets were isolated by differential centrifugation (Ramos *et al.*, 2009). The remaining solid digesta was mixed with an equal volume of Coleman solution (38°C), homogenized and squeezed again. The filtrate was mixed with the strained ruminal fluid and transferred to a separation funnel, 5 g of glucose were added, and the mixture was allowed to flocculate for 1 h at 39°C. The layer containing the protozoa was drawn off, filtered through a 200- μ m nylon cloth (Sefar Maissa S.A., Barcelona, Spain), and repeatedly washed with Coleman buffer to remove the remaining plant material. Finally, the filtrate was filtered through a 10- μ m nylon cloth, washed thoroughly (at least 20 times) to remove contaminating bacteria, and centrifuged (6000 x g, 5 min) to collect protozoal pellets. Samples of SAB and protozoa were freeze-dried, and ground to a fine powder with a mortar and pestle. All SAB pellets obtained in the trial (12 pellets, 6 pellets in each period) were pooled before DNA extraction, and the extracted DNA was considered to be representative of that from the SAB community and used as standard for qPCR analysis. All protozoal pellets (12 pellets, 6 pellets in each period) were also pooled, and the extracted DNA was used as standard for protozoal qPCR analysis.

4.2.2.3 DNA extraction and analysis of microbial communities by quantitative PCR

DNA was isolated in duplicate from freeze-dried solid digesta (120 mg DM) and SAB pellets (30 mg DM) after mechanical disruption of microorganisms with a MiniBeadbeater (3 min; Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) in the presence of 4% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 500 mM NaCl, and 50 mM EDTA. Samples were centrifuged (16 000 x g, 5 min, 4°C) and DNA was extracted from the supernatant using the QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAgen, Valencia, CA, USA). The extraction protocol followed the procedure described by Yu and Morrison (2004) with the exception that an additional step involving the treatment of samples with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was included to remove PCR inhibitors. Eluted DNA was quantified using a Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, DE, USA) at a wavelength of 260 nm. Protozoal DNA extraction protocol was the one described for bacterial DNA, with the exception that bead-beating was substituted by vortexing in order to prevent possible shearing of genomic DNA (Sylvester *et al.*, 2005).

Absolute quantification of total bacteria and protozoa and relative quantification of the three fibrolytic bacteria (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and *R. albus*) and total fungi was performed by qPCR. The DNA extracted from SAB and protozoal pellets was serially diluted (from 10^{-1} to 10^{-5}) and used as standard to quantify the bacterial and protozoal DNA concentration in solid digesta, respectively. The cross-contamination of bacterial DNA in the protozoal DNA was measured by qPCR and subtracted from the concentration determined by spectrophotometry.

Table 4.2.2: Oligonucleotide primers used in this study for quantitative PCR analysis

| Target species | Primer sequence | Size (bp) | Reference |
|----------------------------------|---|-----------|--------------------------------|
| General bacteria | f-CGGCAACGAGCGCGAACCC r-CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC | 130 | Denman and McSweeney, 2006 |
| General anaerobic fungi | f-GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC r-CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT | 120 | Denman and McSweeney, 2006 |
| General protozoa | f-GCTTTCGWTGGTAGTGTATT r-CTTGCCCTCYAATCGTWCT | 223 | Sylvester <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Fibrobacter succinogenes</i> | f-GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA r-CGCCTGCCCCTGAACTATC | 121 | Denman and McSweeney, 2006 |
| <i>Ruminococcus flavefaciens</i> | f-CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG r-CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC | 132 | Denman and McSweeney, 2006 |
| <i>Ruminococcus albus</i> | f-CCCTAAAACCAGTCTTAGTTTCG r-CCTCCTTGCGGTTAGAACA | 176 | Koike and Kobayashi, 2001 |

The extracted DNA was diluted 1:10 before all qPCR analyses. The qPCR was performed in triplicate using an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, UK). Primers sequences for the different microbial groups were chosen from the literature and are given in Table 4.2.2. Amplification efficiencies for each primer pair were investigated by examining dilution series (from 10^{-1} to 10^{-5}) of a pooled DNA template in triplicate and plotting the observed C_q values against the logarithm of total DNA concentration. Values of slopes (ranging from -3.37 to -3.67) and regression coefficients (0.99) were similar to those previously reported for the same primers by Denman and McSweeney (2006) for bacteria, fungi, *F. succinogenes* and *R. flavefaciens*, by Sylvester *et al.* (2004) for protozoa, and by Koike and Kobayashi (2001) for *R. albus*, and PCR efficiencies ranged from 95.9 to 99.2%.

Each reaction mixture (20 μ L final volume) contained 10 μ L SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 0.9 μ L of

20 μM each primer, 6.2 μL of milli Q water and 2 μL of extracted DNA. A no-template (sterile distilled water) negative control was loaded on each plate run to screen for possible contamination and dimer formation and to set background fluorescence for plate normalization. For quantification of total bacteria, fibrolytic bacteria and total fungi, cycling condition were 94°C for 10 min for initial denaturation and 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min for primer annealing and elongation. To determine the specificity of amplification, analysis of product melting was conducted after each amplification. The melting curve was obtained by increasing the temperature at a rate of 0.3°C every 30 s from 60°C to 95°C. All total bacteria qPCR analyses were conducted in one plate. Additionally, each DNA sample was assessed with primers for total bacteria, fungi, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and *R. albus* on the same plate to calculate the relative abundance of each specific DNA relative to total bacterial DNA. Cycling conditions for determination of protozoal DNA concentrations were 94°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 15 s, 54°C for 30 s and 60°C for 1 min. All protozoal qPCR analyses were conducted in one plate.

4.2.2.4 Analysis of bacterial communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA)

Extracted DNA was diluted to a working concentration of 10 ng/mL for ARISA analysis. The DNA was amplified using universal bacterial primers 16S-1392F and 23S-125R (Danovaro *et al.*, 2006; synthesized by Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, Spain), which amplify the ITS1 region in the rRNA operon plus ca. 282 bases of the 16S and 23S RNAs. Primer 23S-125R was fluorescently labelled with the phosphoramidite dye 6-FAM. Each PCR mix (50 μL final volume) contained 1 \times PCR reaction buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 0.25 μM of each primer, each deoxynucleotide triphosphate at a concentration of 0.2 mM, and 2.5 U of Taq Polymerase (Biotools B&M Labs SA, Madrid, Spain). Thermocycling was conducted in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), and started with an initial cycle of denaturation (94°C for 3 min), followed by 30 cycles of denaturation (94°C for 60 s), annealing (55°C for 60 s) and elongation (72°C for 120 s), ending with a final extension step at 72°C for 2 min.

The ARISA technique was performed as described by Ramos *et al.* (2009). Briefly, for each ARISA about 5 ng of amplicon were mixed with an internal size standard (GS 1200 LIZ, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in deionized formamide, then denatured at 94°C for 2 min, and

immediately chilled on ice. Automated detection of ARISA fragments was carried out using an ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with 36-cm by 50- μ m capillary and POP-7 polymer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Peak size and area were estimated by comparison with the internal size standard using the GeneMarker Software v1.80 (SoftGenetics, State College, PA, USA). To include the maximum number of peaks while excluding background fluorescence, a threshold of 100 fluorescence units was used.

It was considered that the peak profile in ARISA electropherograms reflects the predominant bacterial species or populations present in ruminal solid digesta, and only the presence/absence of the different peaks was considered for the analysis. The Shannon diversity index was calculated as described by Shannon and Weaver (1949), and was used to evaluate the diversity of bacterial communities. To analyze the similarity between bacterial communities in the solid digesta of sheep fed AL or GR, a percent similarity index was calculated from the peak profile patterns in the electropherograms of samples from each sheep within sampling time. A dendrogram was constructed using the Pearson product-moment correlation coefficient and unweighted pair-group method (UPGMA) using the MVSP v3.12d software (Kovach Computing Service, Anglesey, Wales, UK). Principal component analysis (PCA) of samples obtained at each sampling time was performed using the MVSP v3.12d software.

4.2.2.5 Chemical analysis

Procedures for analysis of feed chemical composition have been described by Martínez *et al.* (2010). For determination of enzymatic activities in ruminal digesta, samples were thawed at 4°C, and a sub sample (about 6 g) was chopped with scissors. Five g of chopped digesta were weighed, suspended in 25 mL of phosphate buffer (pH = 6.5; 4°C) containing 1 m dithiothreitol, placed in Stomacher standard bags, and homogenized with a Stomacher 400 Circulator (Seward Ltd., London, UK) for 5 min at 230 rev min^{-1} . This treatment was used to detach solid-associated microbes from solid particles (Ramos *et al.*, 2009). The microorganisms present in the suspension were then lysed by bead beating (three 60 s pulses; 0.1 mm zirconia beads) to release intracellular enzymes. Unbroken cell material was removed by centrifugation (10 000 \times g, 10 min, 4°C) and the supernatant was used for analyses. Total carboxymethylcellulase (EC 3.2.1.4.), Avicelase, xylanase (EC 3.2.1.8.), and amylase (EC 3.2.1.1.) activities were determined as described by Giraldo *et al.* (2008) using carboxymethylcellulose, Avicel®, oat

spelt xylan, and soluble starch, respectively, as substrates. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (Madrid, Spain). Enzymatic activities were expressed as μmol of glucose or xylose released from the corresponding substrates by 1 g DM of solid digesta in 1 min at 39°C and pH 6.5.

4.2.2.6 Calculations and statistical analyses

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

Data were analyzed as a mixed model with repeated measures using the PROC MIXED of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). The statistical model used included FOR, period, time and FOR \times time as fixed effects, and sheep as a random effect. Effects were declared significant at $P < 0.05$.

Correlations between pH, enzyme activities and microbial populations were assessed on 24 data (4 animals \times 2 diets \times 3 sampling times) by Pearson correlation analysis using the PROC CORR of SAS. Within each diet, differences in the abundance of the three fibrolytic bacteria were analysed by a paired Student's *t* test.

4.2.3 Results and discussion

Because the microbial community attached to feed particles is known to constitute the greatest and most active ruminal community regarding microbial mass and fibrolytic activities, we decided to assess microbial community structure and enzymatic activities in the solid phase of ruminal digesta. Although similar studies have been conducted previously in cows (Martin *et al.*, 1993; 2001) and sheep (Michalet-Doreau *et al.*, 2001; 2002), most of them were focused on analyzing the changes induced in the rumen by feeding high-concentrate diets and little information is available on sheep fed high-forage diets. Therefore, we decided to monitor fibrolytic microbial populations in the rumen of sheep fed diets based on either alfalfa or grass hay. Alfalfa and grass hay were chosen because they are commonly used as a forage source in sheep feeding, differ in composition and tissue anatomy, and therefore may differ in fiber fermentation rate and extent in the rumen (Van Soest, 1994), thus promoting different microbial communities.

Only few studies have reported DNA yields per gram of ruminal contents. Sharma *et al.* (2003) reported values from 25 to 30 μg DNA per g of

FM sheep ruminal digesta by using a method that combined grinding cells in the presence of liquid N and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) extraction, and Yu and Morrison (2004) found values from 25 to 164 µg DNA per g of FM cows ruminal digesta using different DNA extraction methods. In our study, mean DNA concentrations for AL diet were 19.8, 70.5 and 22.4 µg per g of FM ruminal digesta at 0, 4 and 8 h post-feeding, respectively, and 34.8, 76.1 and 40.6 µg per g of FM ruminal digesta for GR diet (values not shown), being thus in the range of those previously reported. DNA concentrations were affected by sampling time ($P < 0.001$), being for both diets higher ($P < 0.01$) in 4-h samples compared with those taken at 0 and 8 h, with no differences ($P > 0.05$) between concentrations at 0 and 8 h post-feeding. Absorbance ratios (A_{260}/A_{280}) were between 1.72 and 1.98, and were not affected either by sampling time ($P = 0.86$) or FOR ($P = 0.55$).

4.2.3.1 qPCR analysis of microbial communities

As shown in Table 4.2.3, no FOR x time interactions were observed for concentrations of bacterial and protozoal DNA ($P = 0.87$ and 0.84 , respectively), indicating similar postprandial changes with both diets. Concentrations of bacterial DNA in solid ruminal digesta were similar ($P = 0.66$) for both diets, but were affected by time of sampling ($P = 0.008$). Bacterial DNA concentrations declined by 38 and 32% at 4 h after feeding for diets AL and GR, respectively, and then increased at 8 h post-feeding up to values similar ($P > 0.05$) to those before feeding. Similar results have been reported by others in sheep (Martin and Michalet-Doreau, 1995; Michalet-Doreau *et al.*, 2002) and heifers (Bryant and Robinson, 1961; and Leedle *et al.*, 1982) using different methodologies to assess bacterial concentrations, and they have been attributed to the dilution of solid ruminal contents by ingested feed. In our study, offered feed was usually consumed within 1-1.5 h after each feeding. It has to be taken into account that ruminal bacterial concentration is the balance between bacterial growth and lysis, dilution by feed, and turnover of particles, and all these factors are influenced by feed intake level and eating pattern (Leedle *et al.*, 1982; Michalet-Doreau *et al.*, 2002).

Table 4.2.3: Postprandial changes of total bacterial DNA, total protozoal DNA, and the relative abundance of *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, and fungal DNA in solid ruminal contents from sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR (n=4)

| Item and Diet | Time after feeding, h | | | SEM | P-value | | |
|---|-----------------------|--------------------|--------------------|--------|---------|---------|------------|
| | 0 | 4 | 8 | | FOR | Time | FOR x Time |
| Total bacteria ($\mu\text{g DNA / g DM}$) | | | | | | | |
| AL | 290 ^b | 179 ^a | 245 ^{ab} | 26.7 | 0.66 | 0.008 | 0.87 |
| GR | 264 ^b | 180 ^a | 241 ^{ab} | | | | |
| Total protozoa ($\mu\text{g DNA / g DM}$) | | | | | | | |
| AL | 0.23 ^a | 769.6 ^b | 0.06 ^a | 82.053 | 0.68 | <0.001 | 0.84 |
| GR | 0.13 ^a | 685.7 ^b | 0.05 ^a | | | | |
| Relative abundance of | | | | | | | |
| <i>Fibrobacter succinogenes</i> ¹ | | | | | | | |
| AL | 0.06 ^a | 12.51 ^b | 0.10 ^a | 1.844 | <0.001 | < 0.001 | <0.001 |
| GR | 0.08 ^a | 38.58 ^b | 0.13 ^a | | | | |
| <i>Ruminococcus flavefaciens</i> ¹ | | | | | | | |
| AL | 0.001 ^a | 0.278 ^b | 0.001 ^a | 0.0754 | 0.41 | <0.001 | 0.52 |
| GR | 0.002 ^a | 0.433 ^b | 0.002 ^a | | | | |
| <i>Ruminococcus albus</i> ¹ | | | | | | | |
| AL | 0.003 ^a | 0.710 ^b | 0.002 ^a | 0.1229 | 0.76 | < 0.001 | 0.91 |
| GR | 0.002 ^a | 0.803 ^b | 0.002 ^a | | | | |
| Fungi ¹ | | | | | | | |
| AL | 0.001 ^a | 1.588 ^b | 0.001 ^a | 0.2452 | <0.001 | < 0.001 | <0.001 |
| GR | 0.004 ^a | 8.235 ^b | 0.008 ^a | | | | |

a, b Within each row, means with different superscripts differ ($P < 0.05$; Tukey's test). Superscripts are only shown when a significant ($P < 0.05$) P value for time effect was detected.

¹ Microbes DNA measured relative to total rumen bacterial DNA.

Protozoal DNA concentrations in solid ruminal digesta did not differ ($P=0.68$) between diets, but were higher ($P<0.001$) at 4 h post-feeding compared with DNA concentrations at 0 and 8 h. Dehority and Orpin (1997) and Santra *et al.* (1998) reported that protozoa numbers in the liquid phase of the rumen decreased after feeding, and this decrease was attributed to the migration of protozoa to colonize feed particles, which could explain the increase in protozoal DNA concentrations observed in the solid digesta at 4 h post-feeding in our study.

Relative quantification of the abundance of fibrolytic bacteria (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, *R. albus*) showed similar DNA concentrations of the two *Ruminococcus* species with the two experimental diets ($P=0.41$ and 0.76 for *R. flavefaciens* and *R. albus*, respectively), but concentrations of *F. succinogenes* were higher ($P<0.001$) for GR compared with AL diet (Table 4.2.3). Relative abundance of the three cellulolytic bacteria was higher ($P<0.05$) in samples taken at 4 h post-feeding compared with those taken at 0 and 8 h, with no differences ($P>0.05$) detected between 0 and 8 h samplings. These values suggest that fibrolytic bacteria were stimulated by the arrival of fibrous feed to the rumen. Martin *et al.* (2001) analyzed the effect of barley supplementation on fibrolytic bacteria attached to solid ruminal digesta of cows, and reported that concentrations of *F. succinogenes* and *R. flavefaciens* decreased by barley supplementation whereas concentrations of *R. albus* increased. In agreement with the results of Michalet-Doreau *et al.* (2001), positive correlations ($P\leq 0.02$) were observed in our study between the relative population sizes of the three cellulolytic bacterial species (Table 4.2.5), indicating similarities in their response to ruminal conditions.

Of the three monitored species, *F. succinogenes* was the most abundant for both diets ($P<0.05$), with no differences between the two *Ruminococcus* species ($P=0.31$ and 0.21 for AL and GR, respectively). These results are in agreement with previous studies in which *F. succinogenes* was the most predominant, irrespective of dietary conditions, in sheep rumen (Koike and Kobayashi, 2001; Michalet-Doreau *et al.*, 2001, 2002; Koike *et al.*, 2003; Mosoni *et al.*, 2011), batch cultures inoculated with sheep ruminal fluid (Chen *et al.*, 2008), and swamp buffalo rumen (Wanapat and Cherdthong, 2009). All these studies indicate the ecological and functional significance of *F. succinogenes* among the known species of cellulolytic bacteria. In contrast, in studies in cows Martin *et al.* (2001) observed that *R. albus* was the dominant cellulolytic bacterial species using the dot-blot hybridization

technique, whereas Tajima *et al.* (2001) reported that *R. flavofaciens* and *F. succinogenes* reached higher concentrations than *R. albus* using qPCR. The differences in the relative populations of *F. succinogenes* and *Ruminococcus* between these studies might be due to the different methods used to measure bacterial concentrations, composition of the diets used in the experiments, or the specific ruminal populations in experimental animals (Michalet-Doreau *et al.*, 2001).

Fungal DNA concentration, calculated relative to bacterial DNA concentration, was higher ($P < 0.001$) for GR compared with AL diet (Table 4.2.3), and for both diets showed higher ($P < 0.05$) values at 4 h post-feeding compared with those at 0 and 8 h. Ruminal fungi are active degraders of fibrous plant material, and although knowledge of their characteristics is still limited, they are considered to be primary colonizers of plant biomass (Edwards *et al.*, 2008). Joblin *et al.* (1989) found that solubilization of fibrous plant material by ruminal fungi was more extensive than that by cellulolytic bacteria. In fact, several studies have shown that ingested forage is colonized by fungi within 15-20 min of its ruminal incubation (Orpin, 1977; Ho *et al.*, 1988), which is in agreement with the high relative abundance of fungal DNA observed in our study at 4 h post-feeding. It has to be noticed that DNA concentrations of the 3 cellulolytic bacteria and fungi are expressed relative to total bacterial DNA concentration. Total bacterial DNA concentration was higher at 0 and 8 h compared with that at 4 h, thus contributing to the lower relative concentrations of cellulolytic bacterial and fungal DNA observed at 0 and 8 h.

The observed changes in fibrolytic microbial populations in our study do not necessarily imply consequences on ruminal function, as it has been reported that ruminants fed with forages differing in composition and cell wall characteristics had similar fibrolytic activities in the rumen but different forage degradation rates (Nozière *et al.*, 1996).

4.2.3.2 Enzymatic activity

As shown in Table 4.2.4, no FOR \times time interactions ($P = 0.25$ to 0.70) were detected for ruminal pH and enzymatic activities. The diet did not affect ($P = 0.15$ to 0.69) either ruminal pH or CMCase, Avicelase and amylase activities, but xylanase activity was higher ($P = 0.01$) in GR-fed sheep compared with AL-fed sheep. This difference could be attributed to the higher hemicellulose content in GR compared with AL diet, and illustrates the effect of the substrate on fibrolytic activity at similar rumen pH values.

The CMCase, Avicelase and xylanase activities in the solid phase of the rumen were higher ($P < 0.05$) before feeding compared with 4 and 8 h post-feeding, with the exception of Avicelase activity for AL diet which remained unchanged ($P > 0.05$) over time. These results are in agreement with others (Martin *et al.*, 1993, 1999) which showed that fibrolytic activity in the ruminal solid phase of cows was minimum after feeding and increased thereafter to reach maximal values at the end of the postprandial period. Microbial attachment to fibrous substrates is an important prerequisite of fiber degradation in the rumen before cellulolytic microbes start to produce enzymes, which would induce a lag time between arrival of feed in the rumen and its degradation by fibrolytic microbes. Another factor that may have affected fibrolytic enzyme activity is pH. Ruminal pH values dropped ($P < 0.05$) from values higher than 6.60 at 0 h, to values below 6.30 at 4 h post-feeding and close to 6.50 at 8 h post-feeding (Table 4.2.4). According to an *in vitro* study (Stewart, 1977), optimum cellulolytic activity in the ruminal fluid takes place at pH values above 6.7, and decreases drastically at pH below 6.3. The influence of ruminal pH on fibrolytic activities in our study is indicated by the positive correlations ($P \leq 0.02$) found between ruminal pH and Avicelase and xylanase activities, although no correlation ($P = 0.65$) were observed for CMCase activity (Table 4.2.5).

No changes ($P = 0.13$) were observed in amylolytic activity during the feeding cycle, suggesting that changes in ruminal pH over the feeding cycle in our study did not affect amylase activity, which is also indicated by the absence of correlation ($P = 0.47$) between ruminal pH and amylase activities. In concordance with our results, it has been reported that amylolytic enzymes produced by protozoa and fungi have pH optima ranging from 5.0 to 6.5 (Mountfort and Asher, 1988; Williams, 1989).

As shown in Table 4.2.5, no correlations ($P > 0.05$) between enzymatic activities and the relative abundance of individual species of cellulolytic bacterial, protozoal or fungal DNA were detected. This is in agreement with the above discussed delay in the production of fibrolytic enzymes after microbial colonization of feed particles. A lack of correlation between the abundance of cellulolytic bacteria and fibrolytic enzyme activities (Michalet-Doreau *et al.*, 2002) or fermentation parameters (Weimer *et al.*, 1999) has been previously reported, and the authors pointed out that molecular techniques provide no information concerning viability, metabolic activity, or growth stage of the bacteria, all of which affect the production of enzymes and feed degradation. Concentrations of total bacterial DNA were positively correlated ($P = 0.004$ to 0.04) with Avicelase, xylanase and amylase activities.

Table 4.2.4: Postprandial changes of ruminal fluid pH and enzymatic activities in ruminal solid digesta from sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR (n=4)

| Item and Diet ¹ | Time after feeding, h | | | | P-value | | |
|---------------------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|--------|---------|--------|------------|
| | 0 | 4 | 8 | SEM | FOR | Time | FOR x Time |
| pH | | | | | | | |
| AL | 6.83 ^b | 6.23 ^a | 6.43 ^a | 0.084 | 0.69 | <0.001 | 0.25 |
| GR | 6.63 ^b | 6.27 ^a | 6.51 ^{ab} | | | | |
| Enzymatic activity ¹ | | | | | | | |
| CMCase | | | | | | | |
| AL | 3.68 ^b | 2.31 ^a | 2.05 ^a | 0.290 | 0.62 | <0.001 | 0.70 |
| GR | 3.73 ^b | 2.71 ^a | 1.97 ^a | | | | |
| Avicelase | | | | | | | |
| AL | 0.067 | 0.051 | 0.056 | 0.0101 | 0.41 | 0.04 | 0.52 |
| GR | 0.073 ^b | 0.035 ^a | 0.046 ^{ab} | | | | |
| Xylanase | | | | | | | |
| AL | 112 ^b | 62.6 ^a | 60.7 ^a | 8.434 | 0.01 | <0.001 | 0.59 |
| GR | 122 ^b | 88.5 ^a | 84.9 ^a | | | | |
| Amylase | | | | | | | |
| AL | 23.1 | 14.3 | 17.9 | 2.850 | 0.15 | 0.13 | 0.57 |
| GR | 23.0 | 19.5 | 23.3 | | | | |

¹ Carboxymethylcellulase (CMCase), Avicelase and amylase activities are expressed as μmol of glucose released from carboxymethylcellulose, Avicel® and soluble starch, respectively, by 1 g DM of solid phase digesta in 1 min at 39°C and pH 6.5. Xylanase activity is expressed as μmol of xylose liberated from oat spelt xylan by 1 g DM of solid phase digesta in 1 min at 39°C and pH 6.5.

^{a, b} Within each row, means with different superscripts differ ($P < 0.05$; Tukey's test). Superscripts are only shown when a significant ($P < 0.05$) P value for time effect was detected.

Table 4.2.5: Correlation matrix (values of Pearson coefficient; P values in brackets) between ruminal pH, microbial measurements (total bacterial DNA (BAC), total protozoal DNA (PROT), the relative abundance of *Fibrobacter succinogenes* (FS), *Ruminococcus flavefaciens* (RF), *Ruminococcus albus* (RA) and fungal DNA (FUN)) and enzymatic activities (carboxymethylcellulase (CMCase), Avicelase (AV), xylanase (XYL) and amylase (AM)) in the rumen of sheep fed 70:30 forage:concentrate diets with alfalfa hay or grass hay as forage (n=24)

| | pH | BAC | PROT | FS | RF | RA | FUN | CMCase | AV | XYL | AM |
|--------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-------|
| pH | 1.000 | | | | | | | | | | |
| BAC | 0.551 (0.005) | 1.000 | | | | | | | | | |
| PROT | - 0.435 (0.03) | - 0.231 (0.28) | 1.000 | | | | | | | | |
| FS | - 0.326 (0.12) | - 0.339 (0.10) | 0.667 (<0.001) | 1.000 | | | | | | | |
| RF | - 0.274 (0.19) | - 0.407 (0.05) | 0.495 (0.01) | 0.762 (<0.001) | 1.000 | | | | | | |
| RA | - 0.393 (0.06) | - 0.301 (0.15) | 0.752 (<0.001) | 0.806 (<0.001) | 0.489 (0.01) | 1.000 | | | | | |
| FUN | - 0.27 (0.19) | - 0.309 (0.14) | 0.444 (0.03) | 0.903 (<0.001) | 0.661 (<0.001) | 0.639 (0.001) | 1.000 | | | | |
| CMCase | - 0.098 (0.65) | - 0.065 (0.76) | - 0.008 (0.97) | - 0.203 (0.34) | - 0.191 (0.37) | 0.029 (0.89) | - 0.074 (0.73) | 1.000 | | | |
| AV | 0.710 (<0.001) | 0.408 (0.05) | - 0.259 (0.22) | - 0.347 (0.09) | - 0.307 (0.14) | - 0.271 (0.20) | - 0.392 (0.06) | - 0.030 (0.89) | 1.000 | | |
| XYL | 0.465 (0.02) | 0.566 (0.004) | - 0.087 (0.69) | - 0.207 (0.33) | - 0.333 (0.11) | - 0.111 (0.60) | - 0.212 (0.32) | 0.294 (0.16) | 0.200 (0.35) | 1.000 | |
| AM | 0.155 (0.47) | 0.567 (0.004) | - 0.086 (0.69) | - 0.271 (0.20) | - 0.366 (0.08) | - 0.092 (0.60) | - 0.225 (0.29) | 0.099 (0.64) | 0.036 (0.87) | 0.768 (<0.001) | 1.000 |

The lack of correlations between ruminal pH and the abundance of any cellulolytic bacteria ($P>0.05$) observed in our study is in agreement with the results of Martin *et al.* (2001), who observed that supplementing barley (40% of total diet) to cows decreased ruminal pH and fibrolytic activity, but did not change the structure of the cellulolytic bacterial community associated with rumen solid digesta. Previous studies (Russell and Dombrowski, 1980) have shown that the 3 cellulolytic bacteria analyzed in our study were unable to grow at pH below 6.0, and in our study ruminal pH were above 6.2 in all sheep at any sampling time, which would preclude a negative effect of pH on growth of cellulolytic bacteria. In contrast, ruminal pH was positively correlated with total bacteria concentrations ($P=0.005$) and negatively with protozoa concentrations ($P=0.03$). These correlations are probably due only to the similar postprandial evolution of pH and bacterial DNA concentrations and to the opposite evolution of pH and protozoal DNA concentrations.

4.2.3.4 Bacterial community composition assessed by automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA)

The ARISA technique analysis was selected for this study because it is a rapid and effective method for assessing microbial community diversity, and it allows a fast analysis of a large number of samples. A total of 135 peaks were detected in the ARISA electropherograms of solid digesta across the full set of 24 samples, from which 15 were only detected in AL-fed sheep and 14 only in sheep fed GR diet. The number of peaks ranged from 34 to 61 for AL diet, and from 18 to 60 for GR diet. As shown in Table 4.2.6, both number of peaks and Shannon index were higher ($P=0.004$ and <0.001 , respectively) in AL-fed sheep compared with sheep fed GR diet, which would indicate a greater bacterial diversity promoted by AL diet. For both diets, the number of peaks at 4 h post-feeding was lower ($P<0.05$) than that at 0 and 8 h, with no differences ($P>0.05$) between the values at 0 and 8 h ($P>0.05$). Whereas for GR diet Shannon index values were lower ($P<0.05$) at 4 h post-feeding compared with 0 and 8 h samplings, they were not affected ($P>0.05$) by sampling time for AL diet. In agreement with our results, several studies have reported a diet effect on ruminal bacterial diversity, but results are controversial. Larue *et al.* (2005) reported that bacterial diversity was higher in sheep fed only hay than in those fed hay plus 30% of concentrate, Petri *et al.* (2012) in heifers and Kocherginskaya *et al.* (2001) in sheep found higher bacterial diversity in the rumen of animals fed high-concentrate diets

than in those fed diets including higher proportions of forage, but Julien *et al.* (2010) observed no differences in bacterial diversity in cows receiving four diets differing in forage:concentrate ratio. Our results show that the effect of FOR on bacterial diversity was more pronounced at 4 h post-feeding compared with 0 and 8 h, and highlights the importance of sampling the rumen contents at different sampling times.

The similarity index between bacterial communities attached to solid digesta in AL-fed sheep and those in the same sheep when they were fed GR diet ranged from 35.5 to 61.5%, and was lower ($P<0.05$) at 4 h post-feeding compared with 0 and 8 h samplings. These results would also indicate a more pronounced effect of FOR on the structure of rumen bacterial communities attached to feed particles in the first hours after feeding compared with longer post-feeding periods.

Table 4.2.6: Postprandial changes of values of number of peaks and Shannon index in the ARISA electropherograms of solid ruminal contents from sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR and similarity index of ARISA profiles between AL and GR samples from the same sheep ($n=4$)

| Item and Diet | Time after feeding, h | | | | P-value | | |
|---------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------|---------|--------|------------|
| | 0 | 4 | 8 | SEM | FOR | Time | FOR x Time |
| Number of peaks | | | | | | | |
| AL | 50.8 ^b | 33.3 ^a | 50.0 ^b | 3.75 | 0.004 | <0.001 | 0.28 |
| GR | 45.5 ^b | 20.0 ^a | 41.3 ^b | | | | |
| Shannon index | | | | | | | |
| AL | 3.91 | 3.62 | 3.89 | 0.095 | <0.001 | <0.001 | 0.05 |
| GR | 3.78 ^b | 2.99 ^a | 3.66 ^b | | | | |
| Similarity index, % | | | | | | | |
| AL-GR | 51.2 ^b | 40.7 ^a | 54.9 ^b | 3.49 | - | 0.04 | - |

^{a, b} Within each row, means with different superscripts differ ($P<0.05$; Tukey's test). Superscripts are shown only when a significant ($P<0.05$) P value for time effect was detected.

Several studies have pointed out large variations in rumen microbial mass and diversity between animals (Weimer *et al.*, 2009, 2010; Julien *et al.*, 2010), and therefore a cross-over design was used in our study in order to reduce the inter-animal variability. For both diets, sheep 2 had lower ($P<0.01$) numbers of peaks (mean values across sampling times of 37.0 and 26.3 for AL and GR diet, respectively) and Shannon index (3.61 and 3.22 for AL and GR diet, respectively) compared with sheep 1, 3 and 4. Mean peak

numbers for sheep 1, 3 and 4 were 50.7, 47.0 and 49.7 for AL diet and 44.3, 38.7 and 33.0 for GR diet, respectively, and values of Shannon index were 3.90, 3.84 and 3.88 for AL diet and 3.66, 3.58 and 3.44 for the GR diet, respectively (results not shown). These results confirm previous studies (Li *et al.*, 2009; Welkie *et al.*, 2010; Petri *et al.*, 2012) which showed that individual host variation can be responsible for larger differences in ruminal bacterial diversity than those produced by contrasting diets or different sampling times, and highlight the importance of an appropriate experimental design for studies assessing ruminal microbial populations.

Figure 4.2.1 shows the dendrogram of the ARISA profiles of bacterial communities in sheep fed the two experimental diets. Seven out of the 8 samples taken at 4 h post-feeding clustered together, and they subclustered further according diet (AL and GR). In contrast, no clear pattern of clustering according diet, sheep or sampling time was observed for samples taken at 0 and 8 h post-feeding. These results suggest that structure of the bacterial communities found in the solid phase of the rumen change after feeding, which was confirmed by PCA analysis of the samples obtained at each sampling time (Figure 4.2.2). Whereas no clear clustering pattern could be established based on FOR for samples taken immediately before feeding (Figure 4.2.2A), at 4 h post-feeding the PCA clearly discriminated between samples from AL-fed sheep and those from GR-fed sheep (Figure 4.2.2B). At 8 h post-feeding, the 4 samples from AL-fed sheep grouped together below axis 2, and 3 out of the 4 samples from GR-fed sheep grouped above axis 2 (Figure 4.2.2C). Samples from AL-fed sheep grouped closer together than those from sheep fed the GR diet at both 4 and 8 h post-feeding, which suggests that bacterial communities in AL-samples were more similar among them than GR-samples. However, this was not observed at 0 h sampling.

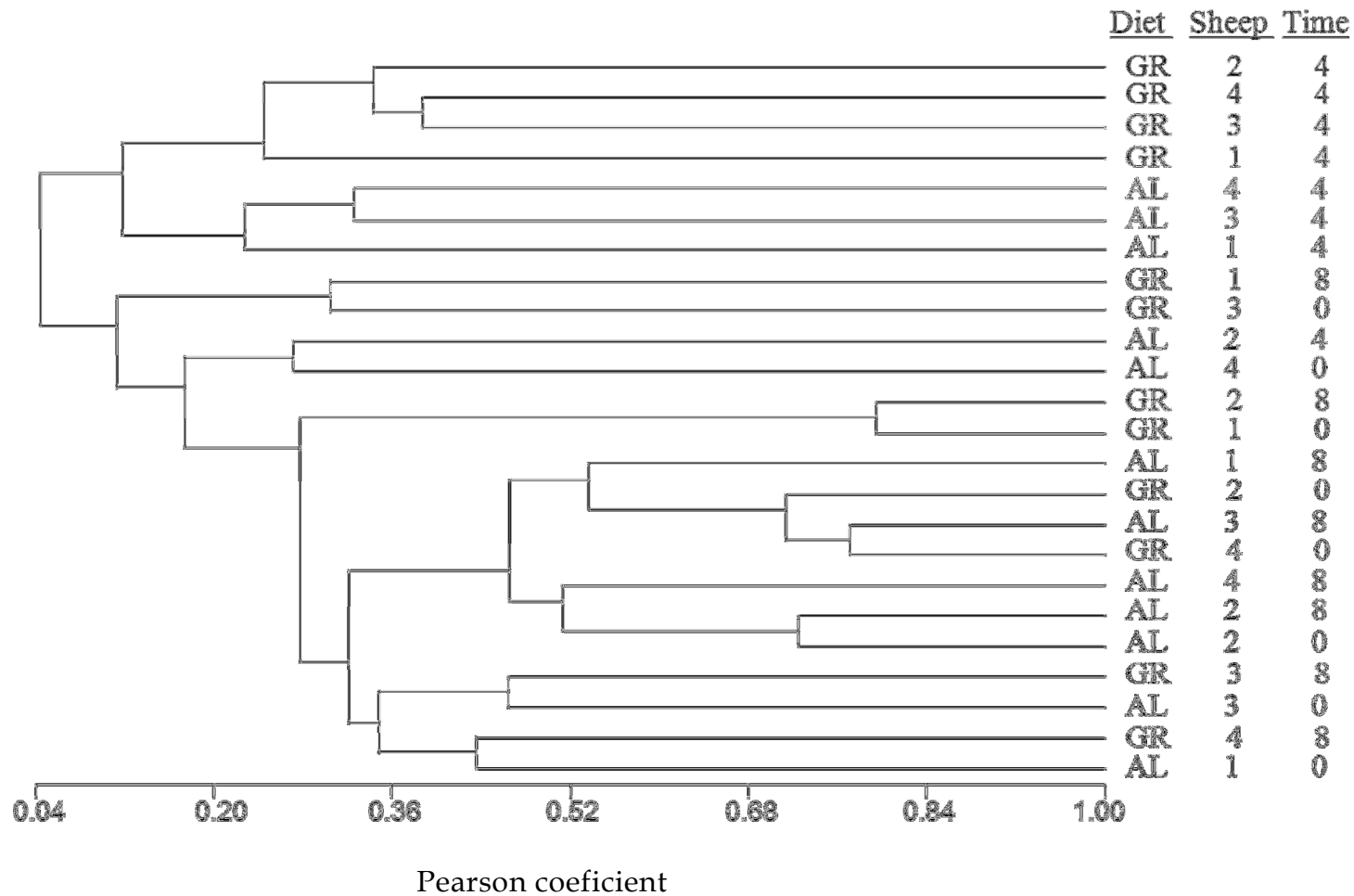


Figure 4.2.1: Dendrogram of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) profiles of bacteria in the solid ruminal digesta from sheep fed diets containing 30% concentrate and 70% alfalfa hay (AL) or grass hay (GR). Numbers 1 to 4 correspond to individual sheep. Samples were taken at 0, 4 and 8 h post-feeding

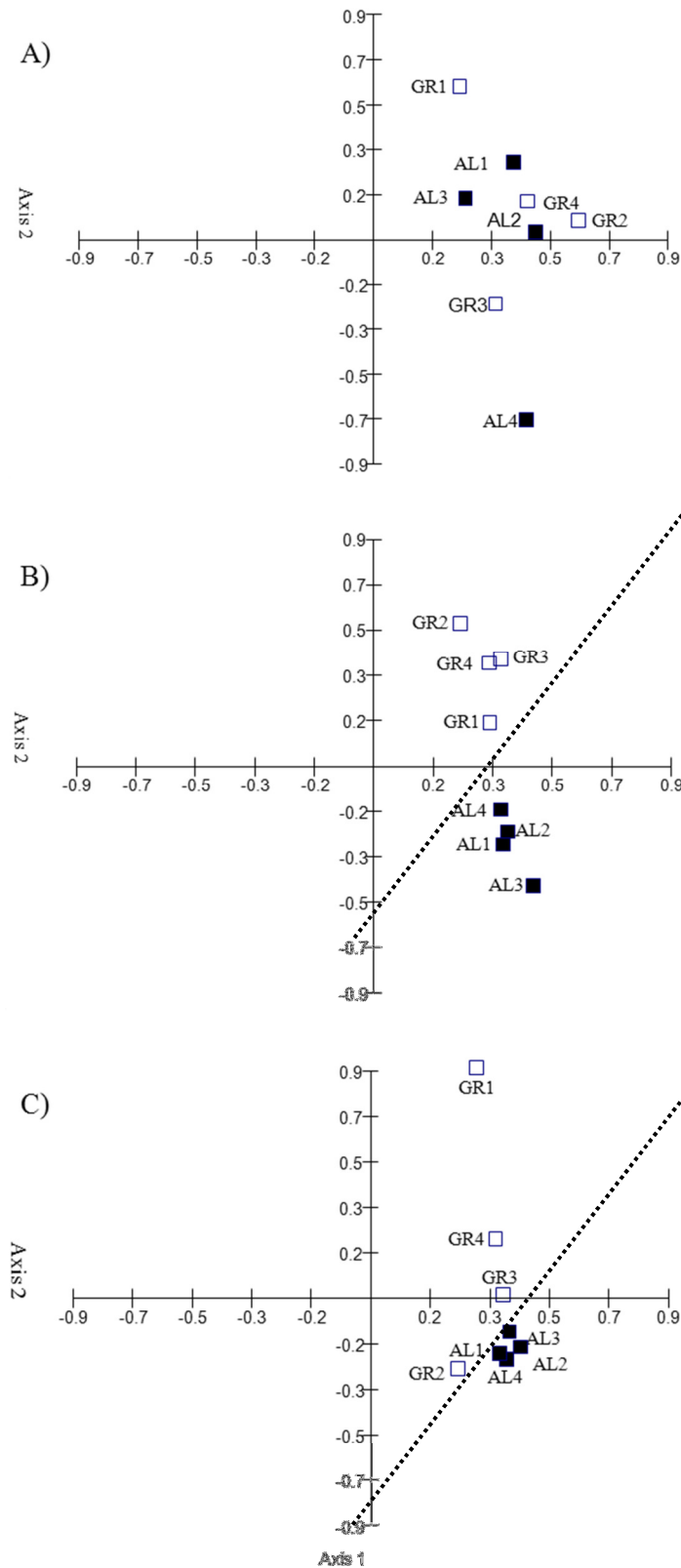


Figure 4.2.2: Principal component analysis generated from automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) profiles of solid ruminal digesta from sheep fed diets containing 30% concentrate and 70% alfalfa hay (AL; shaded symbols) or grass hay (GR; open symbols). Samples were taken at 0 (A), 4 (B) and 8 (C) h post-feeding. Numbers 1 to 4 correspond to individual sheep

In conclusion, postprandial variations in the ruminal concentrations of bacterial, protozoal, cellulolytic bacterial and fungal DNA were similar for both high-forage diets. Whereas concentrations of total bacterial DNA decreased at 4 h post-feeding, concentrations of total protozoal DNA increased. Concentrations of fungal and the three cellulolytic bacterial DNA, measured as relative abundance to total bacterial DNA, increased at 4 h post-feeding compared with prefeeding and longer postprandial periods. *F. succinogenes* was found to be the most dominant of the three cellulolytic species for both diets. Bacterial diversity was higher for AL compared with GR diet, but for both diets was lower at 4 h post-feeding compared with that at longer postprandial periods. The results indicate that the influence of forage type on the structure of rumen bacterial communities in solid digesta from sheep is more evident in the first hours after feeding than at longer post-feeding periods, and highlight the influence of sampling time when investigating the effects of diet on ruminal microbial populations. No significant correlations between the determined enzymatic activities and concentrations of protozoal DNA or the relative abundance of individual species of cellulolytic bacterial and fungal DNA were detected. The influence of the differences between diets in the rumen microbial population observed in this study on the rumen function remains to be determined.

Acknowledgements: Funding was provided by the Spanish CICYT (Project AGL2004-04755-C02-01). C. Saro gratefully acknowledges the receipt of a scholarship from the MEC of Spain (AP2006-03049).

4.2.4 Literature cited

- Briesacher, S. L., T. May, K. N. Grigsby, M. S. Kerley, R. V. Anthony, J. A. Paterson. 1992. Use of DNA probes to monitor nutritional effects on ruminal prokaryotes and *Fibrobacter succinogenes* S85. *J. Anim. Sci.* 70: 289-295.
- Bryant, M. P., I. M. Robinson. 1961. An improved nonselective culture medium for ruminal bacteria and its use in determining diurnal variation in numbers of bacteria in the rumen. *J. Dairy Sci.* 44: 1446-1456.
- Chen, X. L., J. K. Wang, Y. M. Wu, J. X. Liu. 2008. Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid- and solid-associated ruminal microbes *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141: 1-14.
- Danovaro, R., G. M. Luna, A. Dell'Anno, B. Pietrangeli. 2006. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5982-5989.

- Dehority, B. A., C. G. Orpin. 1997. Development of and natural fluctuations in rumen microbial populations, in *The Rumen Microbial Ecosystems*. Hobson, P. N., C. S. Stewart, ed. Blackie Academic & Professional, London, UK.
- Denman, S. E., C. S. McSweeney. 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.
- Edwards, J. E., A. H. Kingston-Smith, H. R. Jimenez, S. A. Huws, K. P. Skøt, G. W. Griffith, N. R. McEwan, M. K. Theodorou. 2008. Dynamics of initial colonization of nonconserved perennial ryegrass by anaerobic fungi in the bovine rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66: 537-545.
- Flint, H. J., V. Aurilia, J. Kirby, K. Miyazaki, M. T. Rincon-Torres, S. I. McCrea, J. C. Martin. 1999. Organization of plant cell wall degrading enzymes in the ruminal anaerobic bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Prevotella bryantii*, in: *Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation*. Ohmiya, K., K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita, S. Kimura, ed. Uni Publishers, Co. Ltd., Tokyo, Japan.
- Giraldo, L. A., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, M. D. Carro. 2008. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141: 306-325.
- Ho, Y. W., N. Abdullah, S. Jalaludin. 1988. Penetrating structures of anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. *J. Gen. Microbiol.* 134: 177-181.
- Joblin, K. N., G. P. Campbell, A. J. Richardson, C. S. Stewart. 1989. Fermentation of barley straw by anaerobic rumen bacteria and fungi in axenic culture and in culture with methanogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 9: 195-197.
- Julien, C., J. P. Marden, C. Bonnefont, R. Moncoulon, E. Auclair, V. Monteils, C. Bayourthe. 2010. Effects of varying proportions of concentrates on ruminal-reducing power and bacterial community structure in dry dairy cows fed hay-based diets. *Animal.* 4: 1641-1646.
- Kocherginskaya, S. A., R. I. Aminov, B. A. White. 2001. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe.* 7: 119-134.
- Koike, S., Y. Kobayashi. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 361-366.
- Koike, S., J. Pan, Y. Kobayashi, K. Tanaka. 2003. Kinetics of *in sacco* fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *J. Dairy Sci.* 86: 1429-1435.
- Larue R., Z. Yu, A. A. Parisi, A. R. Egan, M. Morrison. 2005. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and *rrs* gene sequencing. *Environ. Microbiol.* 7: 530-543.
- Leedle, J. A., M. P. Bryant, R. B. Hespell. 1982. Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low- or high-forage diets. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 402-412.

- Li, M., G. B. Penner, E. Hernandez-Sanabria, M. Oba, L. L. Guan. 2009. Effects of sampling location and time, and host animal on assessment of bacterial diversity and fermentation parameters in the bovine rumen. *J. Appl. Microbiol.* 107: 1924-1934.
- Malburg, S. R. C., L. M. Malburg, T. Liu, A. H. Iyo, C. W. Forsberg. 1997. Catalytic properties of the cellulose-binding endoglucanase F from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2449-2453.
- Martin, C., E. Devillard, B. Michalet-Doreau. 1999. Influence of sampling site on concentrations and carbohydrate-degrading enzyme activities of protozoa and bacteria in the rumen. *J. Anim. Sci.* 77: 979-987.
- Martin, C., B. Michalet-Doreau, G. Fonty, A. Williams. 1993. Postprandial variations in the activity of polysaccharide-degrading enzymes of fluid- and particle-associated ruminal microbial populations. *Curr. Microbiol.* 27: 223-228.
- Martin, C., Michalet-Doreau, B. 1995. Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms: Effect of barley and buffer supplements. *J. Food Agric. Sci.* 67: 407-413.
- Martin, C., Millet, L., Fonty, G., Michalet-Doreau, B. 2001. Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community associated with rumen solid digesta. *Reprod. Nutr. Dev.* 41: 413-424.
- Martínez, M. E., M. J. Ranilla, M. L. Tejido, S. Ramos, M. D. Carro. 2010. Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. I. digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. *J. Dairy Sci.* 93: 3684-3698.
- Michalet-Doreau, B., I. Fernandez, C. Peryon, L. Millet, G. Fonty. 2001. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod. Nutr. Dev.* 41: 187-194.
- Michalet-Doreau, B., I. Fernandez, G. Fonty. 2002. A comparison of enzymatic and molecular approaches to characterize the cellulolytic microbial ecosystems of the rumen and the cecum. *J. Anim. Sci.* 80: 790-796.
- Mosoni, P., F. Chaucheyras-Durand, C. Béra-Maillet, E. Forano. 2007. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: Effect of a yeast additive. *J. Appl. Microbiol.* 103: 2676-2685.
- Mosoni, P., C. Martin, E. Forano, D. P. Morgavi. 2011. Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.* 89: 783-791.
- Mountfort, D. O., R. A. Asher. 1988. Production of α -amylase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2293-2299.
- Nozière, P., Besle, J. M., Michalet-Doreau, B. 1996. Effect of barley supplement on microbial fibrolytic enzyme activities and cell wall degradation rate in the rumen. *J. Sci. Food Agric.* 72: 235-242.

- NRC (National Research Council). Committee on the nutrient requirements of small ruminants. 2007. *Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids*. The National Academies Press, Washington DC, USA.
- Orpin, C. G. 1977. Invasion of plant tissue in the rumen by the flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen. Microbiol.* 98: 423-430.
- Petri, R. M., R. J. Forster, W. Yang, J. J. McKinnon, T. A. McAllister. 2012. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. *J. Appl. Microbiol.* (In press).
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* 29: e45.
- Ramos, S., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, M. E. Martínez, C. Saro, M. D. Carro. 2009. Influence of detachment procedure and diet on recovery of solid-associated bacteria from sheep ruminal digesta and representativeness of bacterial isolates as assessed by automated ribosomal intergenic spacer analysis-polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* 92: 5659-5668.
- Russell, J. B., Dombrowski, D. B. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 604-610.
- Sharma, R., S. J. John, D. M. Damgaard, T. A. McAllister. 2003. Extraction of PCR quality plant and microbial DNA from total rumen contents. *BioTechniques.* 34: 92-97.
- Santra, A., S. A. Karim, A. S. Mishra, O. H. Chaturvedi, R. Prasad. 1998. Rumen ciliate protozoa and fibre utilization in sheep and goats. *Small Rumin. Res.* 30: 13-18.
- Shannon, C. E., W. Weaver. 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press. Urbana, Illinois, USA.
- Stewart, C. S. 1977. Factors affecting the cellulolytic activity of rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 497-502.
- Sylvester, J. T., S. K. R. Karnati, Z. Yu, M. Morrison, J. L. Firkins. 2004. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. *J. Nutr.* 134: 3378-3384.
- Sylvester, J. T., S. K. R. Karnati, Z. Yu, C. J. Newbold, J. L. Firkins. 2005. Evaluation of a real-time PCR assay quantifying the ruminal pool size and duodenal flow of protozoal nitrogen. *J. Dairy Sci.* 88: 2083-2095.
- Tajima, K., R. I. Aminov, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura, Y. Benno. 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl. Environm. Microbiol.* 67: 2766-2774.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell University Press. Ithaca, New York, USA
- Wanapat, M., A. Cherdthong. 2009. Use of real-time PCR technique in studying rumen cellulolytic bacteria population as affected by level of roughage in swamp buffalo. *Curr. Microbiol.* 58: 294-299.
- Weimer, P. J., G. C. Waghorn, C. L. Odt, D. R. Mertens. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 122-134.

- Weimer, P. J., D. M. Stevenson, D. R. Mertens. 2010. Shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat-depressing conditions. *J. Dairy Sci.* 93: 265-278.
- Welkie, D. G., D. M. Stevenson, P. J. Weimer. 2010. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe.* 16: 94-100.
- Williams, A. G. 1989. Metabolic activities of rumen protozoa, in: *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. Nolan, J. V., R. A. Leng, D. I. Demeyer, ed. Penambul Books, Armidale, Australia.
- Yu, Z., M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques.* 36: 808-812.

4.3 PRUEBA 3

INFLUENCE OF FORAGE TYPE ON RUMINAL MICROBES AND BACTERIAL DIVERSITY IN SHEEP

**INFLUENCE OF FORAGE TYPE ON RUMINAL
MICROBES AND BACTERIAL DIVERSITY IN SHEEP**

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

Departamento de Producción Animal. Universidad de León. 24071 León,

Spain

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

Grulleros, León, Spain

Animal Feed Science and Technology (en evaluación)

Influence of forage type on ruminal microbes and bacterial diversity in sheep

Four ruminally cannulated sheep were used in a cross-over design to assess the changes in rumen fluid microbial populations during the feeding cycle in sheep as affected by the type of forage (FOR) in the diet. The 2 experimental diets contained (DM basis) 30% of concentrate and 70% of either alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as forage. Sheep were fed the diets twice daily at a rate of 52 g/kg BW^{0.75} to minimize feed selection, and samples from rumen fluid were taken at 0, 4 and 8 h after the morning feeding. Ruminal pH, lactate concentrations and xylanase activity were not affected ($P=0.42$ to 0.69) by FOR, but NH₃-N and total volatile fatty acid concentrations, and carboxymethylcellulase (CMCase) and amylase activities were greater ($P<0.001$ to 0.04) for AL compared with GR diet. Ruminal pH and CMCase and xylanase activities decreased ($P<0.05$) after feeding, but amylase activity remained unchanged ($P=0.82$) over the feeding cycle. Total protozoa numbers determined by microscopic counting were higher ($P=0.02$) in AL-fed sheep than in sheep fed the GR diet, but concentrations of protozoal DNA determined by quantitative real-time PCR tended ($P=0.06$) to be higher in GR-fed sheep. There was no correlation ($P=0.58$; $n=24$) between protozoal numbers and total protozoal DNA concentrations. Forage type did not affect ($P=0.14$ to 0.89) either the concentration of bacterial DNA or the relative abundance of *Ruminococcus albus* and methanogenic archaea to bacteria. Sheep fed AL had lower ($P<0.001$ to 0.04) abundance of *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* and fungi than did GR-fed sheep. In general, postprandial changes of DNA concentrations of all determined microbial populations were similar for the two diets. Total bacterial and protozoal DNA concentrations decreased ($P<0.05$) at 4 h post-feeding but recovered before-feeding values at 8 h post-feeding. Bacterial diversity assessed by the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) was greater ($P<0.05$) for AL compared with GR diet. Both the number of peaks and Shannon index were greater ($P=0.02$ and 0.03) for AL compared with GR diet. For both diets, the number of peaks was lower ($P<0.05$) at 4 h post-feeding compared with before feeding. No correlations ($P>0.05$) were found between CMCase and xylanase activities and either the concentration of total bacterial DNA or the relative abundance of the three cellulolytic bacteria. In contrast, xylanase activity was positively correlated ($P>0.05$) with protozoa numbers, protozoal DNA concentration and methanogenic archaea. In general, there were small effects of forage on DNA concentrations of the determined microbial populations, as well as on ruminal fibrolytic activity, and the postprandial evolution of all measured parameters were similar for both diets.

Key words: forage, sheep, ruminal microbes, qPCR, ARISA

4.3.1 Introduction

The rumen hosts a complex community of microbes, including bacteria, protozoa, fungi and methanogenic archaea, which are responsible for the enzymatic degradation of feed to provide energy and nutrients for the ruminant host (Firkins *et al.*, 2008). Conventional culture-based methods of enumerating rumen microorganisms are being rapidly replaced by nucleic acid-based techniques which can be used to characterize complex microbial communities without incubation (McSweeney *et al.*, 2007). Although these techniques provide useful information on composition of microbial populations, they usually offer little or no information on the functional role of specific rumen microbes. Therefore, the combination of molecular techniques with measurements of rumen function would help to understand the mechanisms involved in the complex rumen function, as well as to develop strategies for enhancing the ruminant productivity.

The quantitative PCR (qPCR) assay has been used in the last years to measure the abundance of specific rumen microbes in different ruminant species (Tajima *et al.*, 2001; Sylvester *et al.*, 2005; Denman and McSweeney, 2006; Wanapat and Cherdthong, 2009). Additionally, several molecular techniques have been used to analyse the diversity of rumen communities, but the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) is considered to be more sensitive than other fingerprinting methods (Danovaro *et al.*, 2006) and has been recently used to analyse diversity of rumen bacteria (Ramos *et al.*, 2009; Welkie *et al.*, 2010), fungi (Denman *et al.*, 2008) and methanogenic archaea (Sundset *et al.*, 2009). Rumen microbial populations are affected by a wide range of factors, with the diet fed to the host animal being one of the most relevant (Dehority and Orpin, 1997). Previous studies have analyzed the changes in microbial populations when ruminants are switched from forage-based to high-concentrate diets (Kocherginskaya *et al.*, 2001; Tajima *et al.*, 2001; Wanapat and Cherdthong, 2009; Julien *et al.*, 2010), but there is little information on the influence of the forage (FOR) type in the diet on rumen microbes and it is limited to cattle. Because high-forage diets are widely used in sheep practical feeding in the Mediterranean area, the objective of this study was to assess by qPCR the postprandial changes of total bacteria, cellulolytic bacteria, protozoa, fungi and methanogenic archaea in the rumen of sheep fed two diets differing in FOR, and to investigate their relationships with fermentation parameters. In addition, variations in bacterial diversity during the feeding cycle were investigated by ARISA.

4.3.2 Materials and methods

4.3.2.1 Animals and diets

Four ruminally-cannulated merino sheep (58.3 ± 3.27 kg BW) were used in a cross-over design. Sheep were housed in individual pens and had continuous access to fresh water and vitamin/mineral block over the trial. Sheep were cared and handled in accordance with the Spanish Animal Care Regulations, and the experimental protocols were approved by the León University Institutional Animal Care and Use Committee. Two total mixed diets were formulated following NRC (2007) guidelines. The experimental diets contained (DM basis) 30% of concentrate and 70% of either alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as forage source, and their chemical composition is shown in Table 4.3.1.

Table 4.3.1: Chemical composition of the experimental diets containing 70% of alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as forage and 30% of concentrate (dry matter basis)

| Item | AL | GR |
|---|------|------|
| Dry matter (g/kg fresh matter) | 927 | 925 |
| Organic matter (g/kg dry matter) | 913 | 927 |
| Nitrogen (g/kg dry matter) | 26.9 | 19.4 |
| Neutral detergent fiber (aNDF; g/kg dry matter) | 426 | 499 |
| Acid detergent fiber (g/kg dry matter) | 269 | 238 |
| Ether extract (g/kg dry matter) | 20.2 | 19.0 |
| NSC ¹ (g/kg dry matter) | 299 | 288 |
| Metabolizable energy ² (Mcal/kg of dry matter) | 2.12 | 2.00 |

¹ Non-fibre carbohydrates; calculated as $100 - (\text{crude protein} + \text{ash} + \text{aNDF} + \text{ether extract})$. Crude protein was calculated as nitrogen $\times 6.25$.

² Estimated according to the NRC (2007).

The concentrate was based on barley, gluten feed, wheat middlings, soybean meal, palm kernel meal, wheat, corn and mineral/vitamin premix in the proportions of 217, 204, 197, 134, 115, 50, 50 and 33 g/kg, respectively (DM basis), and contained 91.4% DM, 3.04% N, 33.5% aNDF, 12.5% ADF, 2.5% ether extract and 27.9% starch (DM basis). The alfalfa hay was a second-cut harvested at 30% flowering, and it contained 91.3% DM, 2.67% N, 46.6% aNDF, 33.1% ADF and 1.79% ether extract (DM basis). The grass hay

consisted primarily of perennial ryegrass (81%), red and white clover (11%) and other grasses (8%), it was harvested at post-flowering stage, and it contained 93.3% DM, 1.46% N, 56.9% aNDF, 28.6% ADF and 1.68% ether extract (DM basis). Diets were offered to the animals twice daily (08:00 and 20:00 h) at a daily rate of 52 g DM/kg BW^{0.75} to minimize feed selection. This level of intake was estimated to meet 1.2 and 1.1 times the energy maintenance requirements of the experimental sheep for AL and GR diets, respectively (NRC, 2007). Sheep consumed all the diet offered, with the exception of one sheep that occasionally left some refusals (<100 g/d) with diet GR.

4.3.2.2 Experimental procedure and sampling

Each of the two 24-day experimental periods consisted of 21 days of dietary adaptation and 3 days for sample collection. Samples of offered diets were collected daily, composited and dried at 55°C in an oven for 48 h and ground using a Culatti grinder (model DFH 48, Culatti, Zurich, Switzerland) with a 1-mm screen before chemical analyses.

On d 22 and 24 of each period, ruminal content samples (about 500 g) were taken through the cannula of each sheep immediately before the morning feeding (0 h) and at 4 and 8 h after feeding. Samples (mix of liquid and solid) from the dorsal, central and ventral regions of the rumen were collected with a pair of tongs inserted through the rumen cannula to form one composited sample (about 500 g) for each sheep at each sampling time. Ruminal content was strained through 2 layers of cheesecloth, the pH of the fluid was immediately measured, and the following samples were taken. About 20 mL were placed in sterile containers and stored frozen at -80°C until DNA extraction. Five mL of fluid were added to 5 mL of deproteinizing solution (20 g of metaphosphoric acid and 4 g of crotonic acid per L) for VFA analysis, 2 mL were added to 2 mL 0.5 M HCl for NH₃-N determination, and 5 mL were frozen at -20°C for total lactate analyses. Five mL of ruminal fluid were added to 5 mL of methylgreen-formalin solution (Ogimoto and Imai, 1981) and stored at room temperature in the dark until protozoa counting. Ten mL of fluid were immediately frozen at -80°C for determination of carboxymethylcellulase (CMCase), xylanase, and amylase activities. Within each experimental period, the 2 samples taken on the 2 sampling days for each sheep at each sampling time were composited before analysis. Within each period there were 3 samples per sheep (one for each sampling time) for analysis of fermentation parameters, qPCR and protozoa counting.

Additionally, pellets of bacteria and protozoa were isolated to obtain bacterial and protozoal DNA to be used as standard for qPCR analysis. At each sampling time, the remaining fluids of each sheep were mixed to one pooled sample, which was divided into two similar fractions for bacterial and protozoal pellets isolation. Liquid-associated bacteria (LAB) pellets were isolated by differential centrifugation as described Ramos *et al.* (2009) and freeze-dried. The remaining fluid was mixed with an equal volume of Coleman solution (38°C), transferred to a separation funnel, 5 g of glucose were added, and the mixture was allowed to flocculate for 1 h at 39°C. The layer containing the protozoa was drawn off, filtered through a 200- μ m nylon cloth (Sefar Maissa S.A., Barcelona, Spain), and repeatedly washed with Coleman buffer to remove the remaining plant material. Finally, the filtrate was filtered through a 10- μ m nylon cloth, washed thoroughly (at least 20 times) to remove contaminating bacteria, and centrifuged (6000 \times g, 5 min) to collect protozoal pellets. Samples of LAB and protozoal pellets were freeze-dried, and ground to a fine powder with a mortar and pestle. All LAB pellets obtained in the trial (12 pellets, 6 pellets in each period) were pooled before DNA extraction, and the extracted DNA was considered to be representative of that from the LAB community and used as standard for qPCR analysis. All protozoal pellets (12 pellets, 6 pellets in each period) were also pooled, and the extracted DNA was used as standard for protozoal qPCR analysis.

4.3.2.3 DNA extraction and analysis of microbial communities by quantitative PCR (qPCR)

DNA was isolated in duplicate from centrifuged ruminal fluid (4 mL; 20 000 \times g, 5 min, 4°C) and LAB pellets (30 mg DM) after mechanical disruption of microorganisms with a MiniBeadbeater (3 min; Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) in the presence of 4% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 500 mM NaCl, and 50 mM EDTA. Samples were centrifuged (16 000 \times g, 5 min, 4°C) and DNA was extracted from the supernatant using the QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). The extraction protocol followed the procedure described by Yu and Morrison (2004) with the exception that an additional step involving the treatment of samples with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was included to remove inhibitors. Eluted DNA was quantified using a Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, DE, USA) at a wavelength of 260 nm. Protozoal DNA extraction protocol was the one described for bacterial DNA, with the exception that bead-beating was substituted by

vortexing in order to prevent possible shearing of genomic DNA (Sylvester *et al.*, 2005).

Absolute quantification of total bacteria and protozoa and relative quantification of the three fibrolytic bacteria (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and *R. albus*), fungi and methanogenic archaea was performed by qPCR. The DNA extracted from LAB and protozoal pellets was serially diluted (from 10^{-1} to 10^{-5}) and used as standard to quantify the bacterial and protozoal DNA concentration in ruminal fluid, respectively. The cross-contamination of bacterial DNA in the protozoal DNA was measured by qPCR, and subtracted from the concentration determined by spectrophotometry.

Table 4.3.2: Oligonucleotide primers used in this study for quantitative PCR analysis

| Target species | Primer sequence | Size (bp) | Reference |
|----------------------------------|---|-----------|--------------------------------|
| General bacteria | f-CGGCAACGAGCGCGAACCC r-CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC | 130 | Denman and McSweeney, 2006 |
| General anaerobic fungi | f-GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC r-CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT | 120 | Denman and McSweeney, 2006 |
| General protozoa | f-GCTTTCGWTGGTAGTGTATT r-CTTGCCCTCYAATCGTWCT | 223 | Sylvester <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Fibrobacter succinogenes</i> | f-GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA r-CGCCTGCCCTGAACTATC | 121 | Denman and McSweeney, 2006 |
| <i>Ruminococcus flavefaciens</i> | f-CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG r-CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC | 132 | Denman and McSweeney, 2006 |
| <i>Ruminococcus albus</i> | f-CCCTAAAACCAGTCTTAGTTCG r-CTCCTTGCGGTTAGAACA | 176 | Koike and Kobayashi, 2001 |
| General methanogenic archaea | f-TTCGGTGGATCDCARAGRGC r-GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC | 140 | Denman <i>et al.</i> , 2007 |

The extracted DNA was diluted 1:10 before all qPCR analyses. The qPCR was performed in triplicate using an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, UK). Primers sequences for the different microbial groups were chosen from the literature and are given in Table 4.3.2. Amplification efficiencies for each primer pair were investigated by examining dilution series (from 10^{-1} to 10^{-5}) of a pooled DNA template in triplicate and plotting the observed Ct values against the logarithm of total DNA concentration. Values of slopes (ranging from -3.35 to -3.62) and regression coefficients (0.99) were similar to those previously reported for the same primers by Denman and McSweeney (2006) for

bacteria, fungi, *F. succinogenes* and *R. flavefaciens*, by Sylvester *et al.* (2004) for protozoa, by Koike and Kobayashi (2001) for *R. albus*, and PCR efficiencies ranged from 96.1 to 99.5%.

Each reaction mixture (20 μ L final volume) contained 10 μ L SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 0.9 μ L of 20 μ M each primer, 6.2 μ L of milli Q water and 2 μ L of extracted DNA. A no-template (sterile distilled water) negative control was loaded on each plate run to screen for possible contamination and dimer formation and to set background fluorescence for plate normalization. For quantification of total bacteria, fibrolytic bacteria, fungi and methanogenic archaea, cycling condition were 94°C for 10 min for initial denaturation and 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min for primer annealing and elongation. To determine the specificity of amplification, analysis of product melting was conducted after each amplification. The melting curve was obtained by increasing the temperature at a rate of 0.3°C every 30 s from 60°C to 95°C. All total bacteria qPCR analyses were conducted in one plate. Additionally, each DNA sample was assessed with primers for total bacteria, fungi, methanogenic archaea, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and *R. albus* on the same plate to calculate the relative abundance of each specific DNA relative to total bacterial DNA. Cycling conditions for determination of protozoal DNA concentrations were 94°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 15 s, 54°C for 30 s and 60°C for 1 min. All protozoal qPCR analyses were conducted in one plate.

4.3.2.4 Analysis of bacterial communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA)

Extracted DNA was diluted to a working concentration of 10 ng/mL for ARISA analysis. The DNA was amplified using universal bacterial primers 16S-1392F and 23S-125R (Danovaro *et al.*, 2006; synthesized by Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, Spain), which amplify the ITS1 region in the rRNA operon plus ca. 282 bases of the 16S and 23S RNAs. Primer 23S-125R was fluorescently labelled with the phosphoramidite dye 6-FAM. Each PCR mix (50 μ L final volume) contained 1 \times PCR reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 μ M of each primer, each deoxynucleotide triphosphate at a concentration of 0.2 mM, and 2.5 U of Taq Polymerase (Biotools B&M Labs SA, Madrid, Spain). Thermocycling was conducted in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), and started with an initial cycle of denaturation (94°C for 3 min), followed by 30 cycles of denaturation (94°C for 60 s), annealing (55°C for 60 s) and elongation (72°C for 120 s), ending

with a final extension step at 72°C for 2 min. The PCR products were analyzed for quality by electrophoresis in 1% agarose gels, and further purified using a Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol.

The ARISA technique was performed as described by Ramos *et al.* (2009). Briefly, for each ARISA about 5 ng of amplicon were mixed with an internal size standard (GS 1200 LIZ, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in deionized formamide, then denatured at 94°C for 2 min, and immediately chilled on ice. Automated detection of ARISA fragments was carried out using an ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with 36-cm by 50- μ m capillary and POP-7 polymer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Peak size and area were estimated by comparison with the internal size standard using the GeneMarker Software v1.80 (SoftGenetics, State College, PA, USA). To include the maximum number of peaks while excluding background fluorescence, a threshold of 100 fluorescence units was used.

It was considered that the peak profile in ARISA electropherograms reflects the predominant bacterial species or populations present in ruminal solid digesta, and only the presence/absence of the different peaks was considered for the analysis. The Shannon diversity index was calculated as described by Shannon and Weaver (1949), and was used to evaluate the diversity of bacterial communities. To analyze the similarity between bacterial communities in ruminal fluid from sheep fed either AL or GR, a percent similarity index was calculated from the peak profile patterns in the electropherograms of samples from each sheep within sampling time. A dendrogram was constructed using the Pearson product-moment correlation coefficient and unweighted pair-group method (UPGMA) using the MVSP v3.12d software (Kovach Computing Service, Anglesey, Wales, UK). Principal component analysis (PCA) of samples obtained at each sampling time was performed using the MVSP v3.12d software.

4.3.2.5 Chemical analysis

Dry matter (ID 934.01), ash (ID 942.05) and N (ID 984.13) were determined according to the Association of Official Analytical Chemists (1999). aNDF and ADF analyses were carried out according to Van Soest *et al.* (1991) using an ANKOM²²⁰ Fibre Analyzer unit (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA). Sodium sulphite and heat-stable amylase were used in analysis of aNDF and ADF, and they were expressed inclusive

of residual ash. Concentrations of VFA, NH₃-N and total lactate were determined as described by García-Martínez *et al.* (2005). Ciliate protozoa in preserved rumen fluid samples were counted using a Neubauer Improved Bright-Line counting cell (Hausser Scientific, Horsham, PA). Family Isotrichidae and Family Ophryoscolecidae (including subfamilies Entodiniinae, Diplodiniinae, and Ophryoscolecinae) were identified following descriptions by Dehority (1993), and their numbers were separately recorded. Duplicate preparations of each sample were counted, and, if either value differed from the average by more than 10%, the counts were repeated.

For determination of enzymatic activities in ruminal fluid samples, cells were lysed using a Mini-Beadbeater (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK) to release intracellular enzymes. Cell material was removed by centrifugation (10 000 × *g*, 10 min, 4°C) and the supernatant was used for analyses. Carboxymethylcellulase (EC 3.2.1.4.), xylanase (EC 3.2.1.8.), and amylase (EC 3.2.1.1.) activities were determined as described by Giraldo *et al.* (2008) using carboxymethylcellulose, oat spelt xylan, and soluble starch, respectively, as substrates. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (Madrid, Spain). Enzymatic activities were expressed as μmol of glucose or xylose released from the corresponding substrates by 1 mL of ruminal fluid in 1 min at 39°C and pH 6.5.

4.3.2.6 Calculations and statistical analyses

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

Data were analyzed as a mixed model with repeated measures using the PROC MIXED of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). The statistical model used included FOR, period, time and FOR × time as fixed effects, and sheep as a random effect. Effects were declared significant at $P < 0.05$, and $P < 0.10$ was considered a trend.

Correlations between fermentation parameters and microbial populations were assessed on 24 data (4 animals × 2 diets × 3 sampling times) by Pearson correlation analysis using the PROC CORR of SAS. Within each diet, differences in the abundance of the three fibrolytic bacteria were analysed by a paired Student's *t* test.

4.3.3 Results

4.3.3.1 Ruminant fermentation

As shown in Table 4.3.3, there were differences between diets in most of fermentation parameters. Sheep fed AL diet had greater $\text{NH}_3\text{-N}$ ($P<0.001$) and total VFA ($P=0.04$) concentrations compared with those fed GR diet, but there were no differences in ruminal pH ($P=0.69$) or lactate concentrations ($P=0.42$). Feeding GR resulted in higher proportions of acetate and propionate ($P=0.05$ and <0.001 , respectively) and lower ($P<0.001$) of minor VFA in ruminal fluid compared with feeding AL. There were FOR \times time interactions ($P=0.03$ to 0.05) for $\text{NH}_3\text{-N}$ and total VFA concentrations, molar proportions of propionate and butyrate and acetate/propionate ratios. Postprandial changes of fermentation parameters were similar for both diets. Both lactate and $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations decreased after feeding, being lower ($P<0.05$) at 4 and 8 h samplings than before feeding for both diets. In contrast, total VFA concentrations increased ($P<0.05$) at 4 h post-feeding, and then lowered to values similar to those before feeding. For both diets, molar proportions of propionate increased ($P<0.05$) and those of minor VFA ($P<0.05$) decreased after feeding.

No FOR \times time interactions ($P=0.18$ to 0.99) were detected in any determined enzymatic activity (Table 4.3.3). Sheep fed AL diet had higher CMCCase ($P=0.01$) and amylase ($P=0.03$) activities than GR-fed sheep, but no differences between diets were observed in xylanase activity. Whereas CMCCase and xylanase activities were lower ($P<0.05$) at 4 h post-feeding compared with values determined immediately before feeding, amylase activity remain unchanged ($P=0.82$) over the feeding cycle.

4.3.3.2 Microbial populations

As shown in Table 4.3.4, FOR \times time interactions ($P=0.01$) were detected for both total protozoa and Entodiniinae numbers. Sheep fed AL diet had higher ($P=0.02$) numbers of total protozoa and Entodiniinae compared with GR-fed sheep, and tended ($P=0.08$) to have higher concentrations of Diplodiniinae and Ophryoscolecinae numbers. For both diets, total protozoa, Entodiniinae, and Isotrichidae numbers decreased ($P=0.05$) at 4 h after feeding and remained lower ($P=0.05$) than before feeding at 8 h post-feeding. Differences between sampling times in Diplodiniinae and Ophryoscolecinae numbers were only observed for AL diet, with numbers before feeding being higher ($P<0.05$) than those at 4 and 8 h post-feeding.

Table 4.3.3: Postprandial changes of fermentation parameters and enzymatic activities in the ruminal fluid of sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR (n=4)

| Item | Diet | Time after feeding, h | | | SEM | P-value | | |
|--------------------------|------|-----------------------|--------------------|--------------------|-------|---------|--------|------------|
| | | 0 | 4 | 8 | | FOR | Time | FOR x Time |
| pH | AL | 6.83 ^b | 6.23 ^a | 6.43 ^b | 0.084 | 0.69 | <0.001 | 0.25 |
| | GR | 6.63 ^b | 6.27 ^a | 6.51 ^{ab} | | | | |
| NH ₃ -N, mg/L | AL | 209 ^b | 196 ^b | 111 ^a | 10.83 | <0.001 | <0.001 | 0.03 |
| | GR | 120 ^b | 74.7 ^a | 56.1 ^a | | | | |
| Lactate, mg/L | AL | 40.7 ^b | 30.3 ^a | 27.2 ^a | 3.11 | 0.42 | 0.01 | 0.49 |
| | GR | 38.7 ^b | 35.8 ^a | 30.0 ^a | | | | |
| Total VFA, mmol/L | AL | 76.6 ^a | 115.5 ^b | 84.8 ^a | 4.23 | 0.04 | <0.001 | 0.05 |
| | GR | 78.3 ^a | 94.6 ^b | 80.5 ^a | | | | |
| VFA, mol/100 mol | | | | | | | | |
| Acetate | AL | 66.4 ^a | 66.2 ^a | 68.4 ^b | 0.52 | 0.05 | 0.001 | 0.59 |
| | GR | 67.9 ^{ab} | 66.6 ^a | 69.2 ^b | | | | |
| Propionate | AL | 14.9 ^a | 19.1 ^c | 16.7 ^b | 0.32 | <0.001 | <0.001 | 0.03 |
| | GR | 17.7 ^a | 20.7 ^b | 17.8 ^a | | | | |
| Butyrate | AL | 12.8 ^b | 10.1 ^a | 11.0 ^b | 0.42 | 0.07 | 0.01 | 0.03 |
| | GR | 10.9 | 10.8 | 10.3 | | | | |
| Others ¹ | AL | 5.75 ^b | 4.45 ^a | 3.78 ^a | 0.241 | <0.001 | 0.001 | 0.08 |
| | GR | 3.35 ^b | 2.47 ^a | 2.56 ^a | | | | |
| Acetate/propionate, | AL | 4.59 ^c | 3.54 ^a | 4.21 ^b | 0.090 | <0.001 | <0.001 | 0.03 |
| | GR | 3.90 ^b | 3.37 ^a | 3.92 ^b | | | | |

(continued)

Table 4.3.3: Continued

| Item | Diet | Time after feeding, h | | | SEM | FOR | P-value | |
|-----------------------------------|------|-----------------------|-------------------|--------------------|-------|------|---------|------------|
| | | 0 | 4 | 8 | | | Time | FOR x Time |
| Enzymatic activities ² | | | | | | | | |
| CMCase | AL | 0.81 ^b | 0.65 ^a | 0.70 ^{ab} | 0.04 | 0.01 | <0.001 | 0.18 |
| | GR | 0.73 ^b | 0.46 ^a | 0.67 ^b | | | | |
| Xylanase | AL | 7.38 ^b | 4.39 ^a | 5.46 ^a | 0.570 | 0.61 | <0.001 | 0.99 |
| | GR | 7.10 ^b | 4.09 ^a | 5.30 ^a | | | | |
| Amylase | AL | 2.18 | 2.54 | 2.57 | 0.303 | 0.03 | 0.82 | 0.57 |
| | GR | 1.94 | 1.65 | 1.91 | | | | |

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

¹ calculated as the sum of isobutyrate, isovalerate, valerate and caproate.

² Carboxymethylcellulase (CNCCase) and amylase activities are expressed as μmol of glucose released from carboxymethylcellulose and soluble starch, respectively, by 1 mL of ruminal fluid in 1 min at 39°C and pH 6.5. Xylanase activity is expressed as μmol of xylose liberated from oat spelt xylan by 1 mL of ruminal fluid in 1 min at 39°C and pH 6.5.

Table 4.3.4: Postprandial changes of protozoa numbers determined by microscopic counting in ruminal fluid from sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR (n=4)

| Item | Diet | Time after feeding, h | | | SEM | P-value | | |
|--|------|-----------------------|-------------------|--------------------|-------|---------|--------|------------|
| | | 0 | 4 | 8 | | FOR | Time | FOR x Time |
| Protozoa numbers (x 10 ⁴ /mL) | | | | | | | | |
| Total protozoa | AL | 118.9 ^b | 50.8 ^a | 50.3 ^a | 6.78 | 0.02 | <0.001 | 0.01 |
| | GR | 74.6 ^b | 47.2 ^a | 52.1 ^a | | | | |
| Entodiniinae | AL | 109.2 ^b | 46.7 ^a | 46.9 ^a | 6.87 | 0.02 | <0.001 | 0.01 |
| | GR | 67.6 ^b | 42.6 ^a | 49.2 ^{ab} | | | | |
| Isotrichidae | AL | 4.85 ^b | 2.36 ^a | 1.72 ^a | 0.523 | 0.48 | 0.001 | 0.66 |
| | GR | 4.81 ^b | 3.23 ^a | 1.83 ^a | | | | |
| Diplodiniinae | AL | 4.04 ^b | 1.67 ^a | 1.50 ^a | 0.657 | 0.08 | 0.04 | 0.39 |
| | GR | 1.94 | 1.21 | 0.99 | | | | |
| Ophryoscolecinae | AL | 0.83 ^b | 0.15 ^a | 0.17 ^a | 0.169 | 0.08 | 0.04 | 0.25 |
| | GR | 0.23 | 0.10 | 0.04 | | | | |

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

¹ Microbes DNA measured relative to total bacterial DNA.

Table 4.3.5: Postprandial changes of, concentrations of total bacterial DNA, total protozoal DNA, and the relative abundance of *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes*, fungal and methanogenic archaeal DNA in ruminal fluid from sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR (n=4)

| Item | Diet | Time after feeding, h | | | SEM | P-value | | |
|--|------|-----------------------|--------------------|--------------------|--------|---------|--------|------------|
| | | 0 | 4 | 8 | | FOR | Time | FOR x Time |
| Total bacterial DNA ($\mu\text{g DNA / mL}$) | AL | 12.3 ^b | 5.8 ^a | 14.8 ^b | 1.62 | 0.89 | <0.001 | 0.75 |
| | GR | 13.4 ^b | 4.3 ^a | 14.7 ^b | | | | |
| Total protozoal DNA ($\mu\text{g DNA / mL}$) | AL | 11.3 | 7.5 | 18.1 | 4.53 | 0.06 | 0.25 | 0.56 |
| | GR | 23.3 | 15.7 | 20.3 | | | | |
| Relative abundance of ¹ | | | | | | | | |
| <i>Fibrobacter succinogenes</i> | AL | 0.064 | 0.044 | 0.037 | 0.0308 | 0.005 | 0.36 | 0.10 |
| | GR | 0.066 | 0.176 | 0.157 | | | | |
| <i>Ruminococcus flavefaciens</i> | AL | 0.012 | 0.009 | 0.012 | 0.0320 | <0.001 | 0.24 | 0.21 |
| | GR | 0.013 | 0.184 | 0.068 | | | | |
| <i>Ruminococcus albus</i> | AL | 0.038 | 0.078 | 0.034 | 0.0195 | 0.41 | 0.03 | 0.82 |
| | GR | 0.041 ^a | 0.105 ^b | 0.044 ^a | | | | |
| Fungi | AL | 0.001 | 0.004 | 0.001 | 0.0015 | 0.05 | 0.002 | 0.11 |
| | GR | 0.001 ^a | 0.011 ^b | 0.002 ^a | | | | |
| Methanogenic archaea | AL | 0.111 ^b | 0.013 ^a | 0.015 ^a | 0.0192 | 0.14 | 0.03 | 0.06 |
| | GR | 0.026 | 0.019 | 0.020 | | | | |

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

¹ Microbes DNA measured relative to total bacterial DNA.

Mean DNA concentrations in ruminal fluid were similar ($P=0.37$) for both diets, with mean values of 2.57, 2.11 and 3.34 μg per mL of fluid at 0, 4 and 8 h post-feeding, respectively, for AL diet and 2.15, 2.06 and 3.12 μg per mL of fluid for GR diet. DNA concentrations were affected by sampling time ($P<0.001$), being lower ($P<0.01$) in samples taken at 4 h post-feeding compared with those taken at 0 and 8 h for both diets, with no differences ($P>0.05$) between concentrations at 0 and 8 h post-feeding (results not shown). Absorbance ratios (A_{260}/A_{280}) were between 1.72 and 2.00, and were not affected either by sampling time ($P=0.11$) or FOR ($P=0.48$).

No FOR \times time interactions ($P=0.11$ to 0.82) were observed for concentrations of any microbial DNA, with the exception of a trend detected in methanogenic archaea ($P=0.06$; Table 4.3.5). Concentrations of bacterial DNA in ruminal fluid were similar ($P=0.89$) for both diets, but were affected by time of sampling ($P<0.001$). Bacterial DNA concentrations declined by 53% and 68% at 4 h after feeding for diets AL and GR, respectively, and then increased at 8 h post-feeding up to values similar ($P>0.05$) to those before feeding. Concentrations of protozoal DNA tended ($P=0.06$) to be higher with GR diet compared with AL diet, but they were not affected by sampling time.

Relative quantification of the abundance of fibrolytic bacteria (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, *R. albus*), fungi and methanogenic archaea showed similar DNA concentrations of *R. albus* and methanogenic archaea ($P=0.41$ and 0.14, respectively) for both diets. In contrast, relative abundance of *F. succinogenes* and *R. flavefaciens* was higher ($P=0.005$ and <0.001 , respectively) and that of fungi tended to be higher ($P=0.05$) for GR compared with AL diet (Table 4.3.5). Whereas concentrations of *F. succinogenes* and *R. flavefaciens* remained unchanged ($P=0.36$ and 0.24, respectively) over the feeding cycle for both diets, relative abundance of *R. albus*, fungi and methanogenic archaea were affected ($P=0.002$ to 0.03) by sampling time. For AL diet, *F. succinogenes* and *R. albus* were more abundant ($P<0.01$) than *R. flavefaciens*, with no difference ($P=0.88$) between *F. succinogenes* and *R. albus*. With GR diet, *F. succinogenes* and *R. flavefaciens* were more abundant ($P<0.05$) than *R. albus*, with no difference ($P=0.89$) between *F. succinogenes* and *R. flavefaciens*.

Table 4.3.6: Correlation matrix (values of Pearson coefficient; *P* values in brackets) between microbial measurements (total bacterial DNA (TB) and total protozoal DNA (TPR), relative abundance of *Fibrobacter succinogenes* (FS), *Ruminococcus flavefaciens* (RF), *Ruminococcus albus* (RA), fungal DNA (FUN) and methanogenic archaea DNA (MAR) and numbers of total protozoa (PRN) and Entodiniinae (ENN)) and fermentation parameters (pH, concentrations of lactate (LAC), NH₃-N (AMO) and total VFA (VFA), molar proportions of acetate (AC), propionate (PR), butyrate (BT), and other VFA (OVFA, calculated as the sum of isobutyrate, isovalerate, valerate and caproate), acetate:propionate ratio (Ac/Pr) and enzymatic activities (carboxymethylcellulase (CMCase), xylanase (XYL) and amylase (AM)) in ruminal fluid of sheep fed 70:30 forage:concentrate diets with alfalfa hay or grass hay as forage (n=24)

| | TB | TPR | FS | RF | RA | FUN | MAR | PRN | ENN |
|--------|-------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| pH | 0.81 (<0.001) | -0.11 (0.60) | -0.21 (0.33) | -0.58 (0.003) | -0.72 (<0.001) | -0.29 (0.17) | -0.00 (0.98) | 0.27 (0.21) | 0.23 (0.28) |
| LAC | -0.30 (0.15) | 0.15 (0.49) | -0.01 (0.97) | 0.55 (0.01) | 0.51 (0.01) | -0.22 (0.29) | 0.43 (0.03) | 0.34 (0.10) | 0.31 (0.14) |
| AMO | -0.17 (0.42) | -0.23 (0.28) | -0.40 (0.06) | -0.15 (0.49) | 0.13 (0.56) | -0.19 (0.38) | 0.46 (0.02) | 0.48 (0.02) | 0.46 (0.02) |
| VFA | -0.60 (0.002) | 0.01 (0.95) | -0.08 (0.72) | 0.30 (0.15) | 0.58 (0.003) | 0.18 (0.39) | 0.08 (0.71) | -0.20 (0.34) | -0.20 (0.35) |
| AC | 0.67 (<0.001) | -0.06 (0.76) | -0.00 (0.99) | -0.49 (0.02) | -0.75 (<0.001) | -0.01 (0.98) | -0.38 (0.07) | -0.26 (0.21) | -0.25 (0.25) |
| PR | -0.73 (<0.001) | 0.42 (0.04) | 0.36 (0.09) | 0.50 (0.01) | 0.66 (<0.001) | 0.21 (0.32) | -0.01 (0.95) | -0.14 (0.52) | -0.09 (0.69) |
| BT | 0.21 (0.34) | 0.24 (0.25) | 0.28 (0.19) | 0.14 (0.52) | 0.03 (0.89) | 0.11 (0.60) | 0.33 (0.11) | 0.24 (0.25) | 0.16 (0.44) |
| OVFA | 0.19 (0.39) | -0.48 (0.02) | -0.42 (0.04) | -0.43 (0.04) | -0.18 (0.41) | -0.28 (0.18) | 0.31 (0.14) | 0.42 (0.04) | 0.41 (0.04) |
| Ac/Pr | 0.74 (<0.001) | -0.41 (0.05) | -0.32 (0.13) | -0.54 (0.01) | -0.68 (<0.001) | -0.22 (0.24) | -0.04 (0.85) | 0.15 (0.49) | 0.10 (0.63) |
| CMCase | 0.12 (0.58) | 0.23 (0.28) | -0.37 (0.07) | 0.11 (0.60) | -0.07 (0.76) | -0.58 (0.003) | 0.37 (0.07) | 0.38 (0.06) | 0.38 (0.07) |
| XYL | 0.12 (0.56) | 0.42 (0.04) | -0.28 (0.18) | -0.08 (0.71) | -0.23 (0.28) | -0.40 (0.06) | 0.45 (0.03) | 0.54 (0.006) | 0.52 (0.01) |
| AM | -0.46 (0.02) | 0.38 (0.07) | -0.10 (0.64) | 0.25 (0.24) | 0.35 (0.09) | -0.44 (0.03) | 0.31 (0.14) | 0.21 (0.33) | 0.27 (0.21) |

Table 4.3.6 shows the correlation coefficients between microbial measurements and ruminal fermentation parameters and enzymatic activities. Regarding ruminal parameters, concentrations of total bacterial DNA showed correlations ($P < 0.01$) with ruminal pH, total VFA

concentration, molar proportions of acetate and propionate, and acetate/propionate ratio ($r=0.81, -0.60, 0.67, 0.73$ and 0.74 , respectively), but total protozoal DNA was only correlated ($P<0.05$) with molar proportions of propionate and other minor VFA ($r=0.42$ and -0.48 , respectively). Whereas the relative abundance of both *R. flavefaciens* and *R. albus* were correlated ($P<0.05$) with ruminal pH, lactate concentrations, molar proportions of acetate and propionate and acetate/propionate ratio, concentrations of *F. succinogenes* only showed correlations with the molar proportion of other minor VFA ($r=-0.42$). No correlations ($P>0.05$) were found between the abundance of fungi and ruminal parameters, but abundance of methanogens was correlated ($P<0.05$) with lactate and $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations ($r=0.43$ and 0.46 , respectively). Total protozoa and Entodiniinae numbers were correlated with $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations ($r=0.48$ and 0.46 , respectively) and molar proportion of other VFA ($r=0.42$ and 0.41 , respectively). CMCase activity was only correlated ($P=0.003$) with the relative abundance of fungi ($r=-0.46$), whereas xylanase activity was correlated ($P<0.05$) with total protozoal DNA ($r=0.42$), relative abundance of methanogenic archaea ($r=0.45$) and numbers of protozoa ($r=0.54$) and Entodiniinae ($r=0.52$), and amylase activity was correlated with total bacterial DNA ($r=-0.46$) and the relative abundance of *R. albus* ($r=-0.44$). Correlations between the relative abundance of the individual species of cellulolytic bacteria with enzyme activities were not significant ($P>0.05$).

4.3.3.3 Bacterial diversity

The ARISA technique was selected to assess bacterial diversity because it allows a fast analysis of a large number of samples. A total of 123 peaks were detected in the ARISA electropherograms of ruminal fluid across the full set of 24 samples, from which 18 were only detected in AL diet samples and 12 only in sheep fed GR diet. The number of peaks ranged from 32 to 61 for AL diet, and from 28 to 54 for GR diet (values not shown). As shown in table 4.3.6, both number of peaks and Shannon index were higher ($P=0.02$ and 0.03 , respectively) in AL-fed sheep compared with sheep fed GR diet. In sheep fed GR diet, the number of peaks and Shannon index decreased ($P<0.05$) at 4 h, but at 8 h post-feeding values were similar ($P>0.05$) to those obtained before feeding. In sheep fed AL-diet, the number of peaks and Shannon index were higher ($P<0.05$) before feeding than at 8 h post-feeding, with 4 h-samples having intermediate values. No FOR \times time interactions were observed for either the number of peaks ($P=0.62$) or Shannon index ($P=0.67$). The similarity index between bacterial communities in the ruminal fluid in AL-fed sheep and those in the same sheep when they

were fed GR diet ranged from 21.5 to 60.5%, and was not affected ($P=0.86$) by time after feeding.

Table 4.3.7: Postprandial changes of mean values of Shannon index and numbers of peaks detected in the ARISA electropherograms of ruminal fluid from sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR and similarity index of ARISA profiles between AL and GR samples from the same sheep ($n=4$)

| Item and Diet | Time after feeding, h | | | SEM | P-value | | |
|-------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|-------|---------|------|------------|
| | 0 | 4 | 8 | | FOR | Time | FOR x Time |
| Number of peaks | | | | | | | |
| AL | 52.0 ^b | 46.3 ^{ab} | 44.0 ^a | 2.57 | 0.02 | 0.03 | 0.62 |
| GR | 46.0 ^b | 38.5 ^a | 41.3 ^{ab} | | | | |
| Shannon index | | | | | | | |
| AL | 3.95 ^b | 3.82 ^{ab} | 3.77 ^a | 0.061 | 0.03 | 0.04 | 0.67 |
| GR | 3.83 ^b | 3.65 ^a | 3.70 ^{ab} | | | | |
| Similarity index, | | | | | | | |
| AL-GR | 46.2 | 49.0 | 45.2 | 5.07 | - | 0.86 | - |

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

Figure 4.3.1 shows the dendrogram of the ARISA profiles of bacterial communities in ruminal fluid of sheep fed the two experimental diets. Seven out of the 8 samples taken at 8 h post-feeding clustered together, but no clear pattern of subclustering was observed. The rest of samples formed several clusters. For diet GR, the 4 samples taken at 4 h post-feeding grouped together and 3 out of the 4 taken at before feeding formed a different subgroup. For diet AL, in general the 2 samples from the same sheep (taken at 0 and 4 h) shared above 50% of similarity to each other. The lack of a clear clustering pattern according FOR or sheep was confirmed by PCA analysis of the samples obtained at each sampling time (Figure 4.3.2). No clear clustering pattern could be established based on FOR for samples taken immediately before feeding or at 8 h post-feeding. At 0 h, 3 samples from GR-fed sheep grouped together below axis 2, but one was above axis 2 (Figure 4.3.2A). At 8 h post-feeding, 3 samples from AL-fed sheep grouped together below axis 2, but the other was above axis 2 (Figure 4.3.2C). At 4 h post-feeding samples from GR-fed sheep grouped quite closely above axis 2, but AL-samples showed a higher dispersion (Figure 4.3.2B).

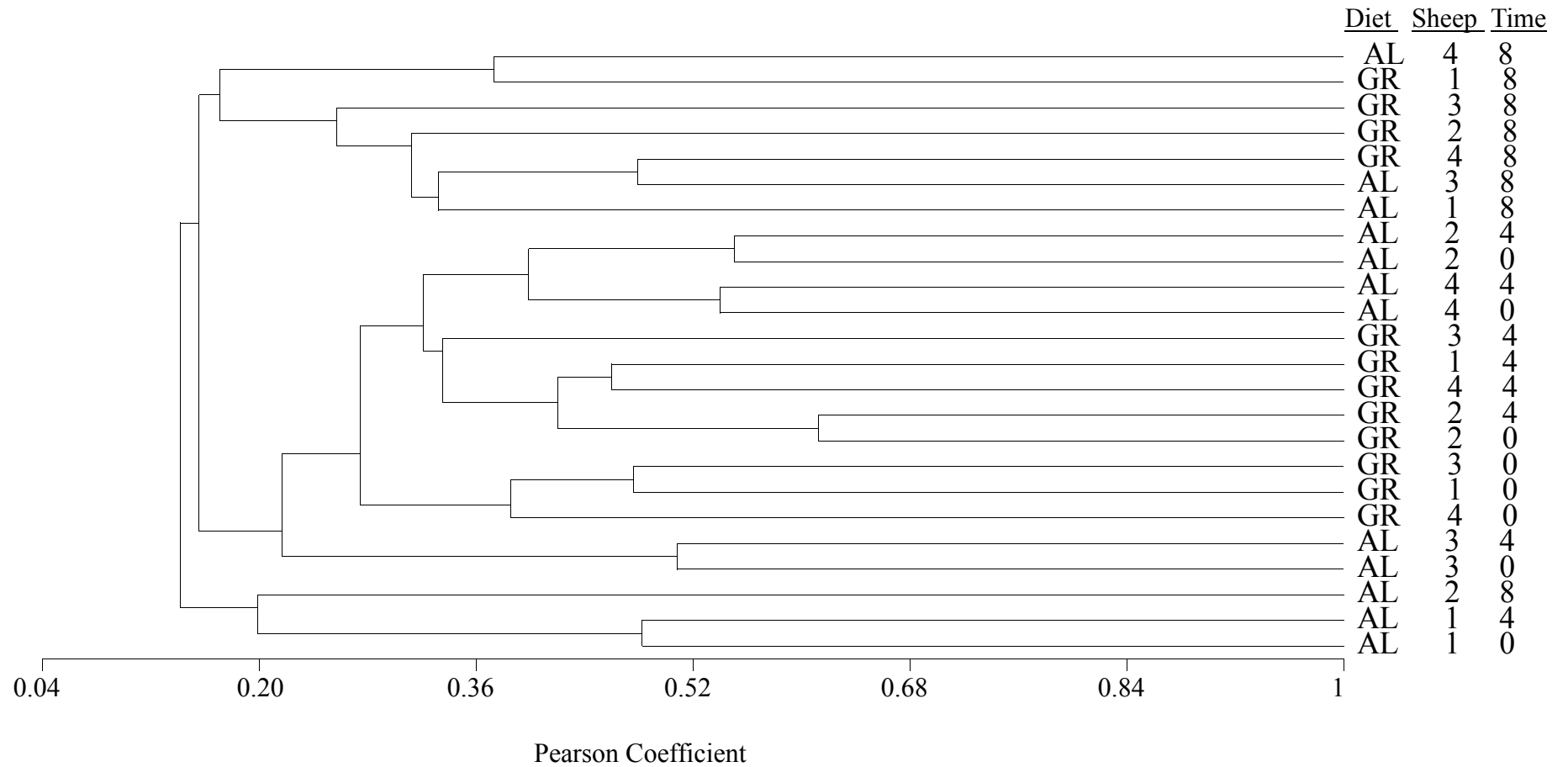


Figure 4.3.1: Dendrogram of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) profiles of ruminal fluid from sheep fed diets containing 30% concentrate and 70% alfalfa hay (AL) or grass hay (GR). Numbers 1 to 4 correspond to individual sheep. Samples were taken at 0, 4 and 8 h post-feeding

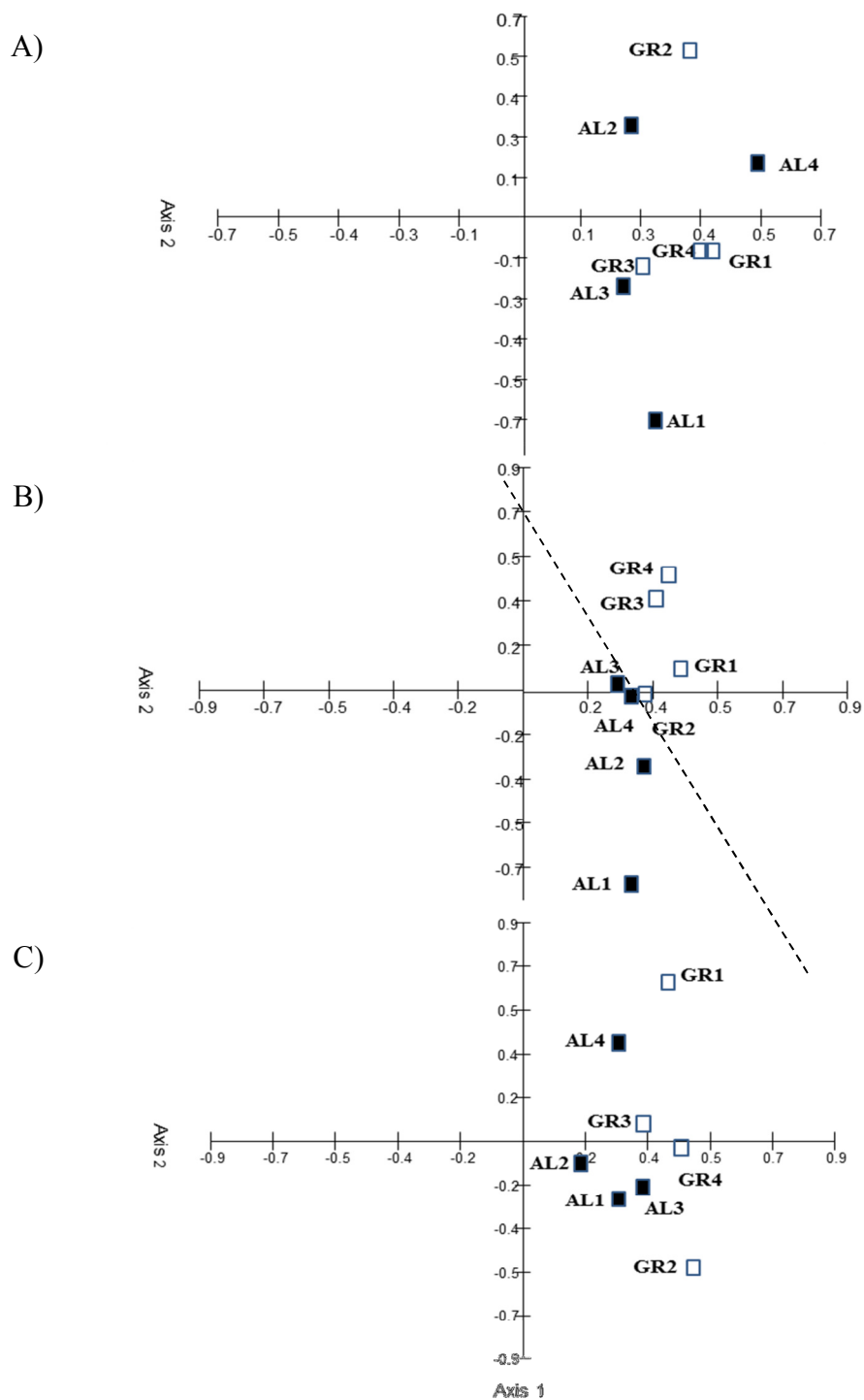


Figure 4.3.2: Principal component analysis generated from automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) profiles of ruminal fluid from sheep fed diets containing 30% concentrate and 70% alfalfa hay (AL; shaded symbols) or grass hay (GR; open symbols). Samples were taken at 0 (A), 4 (B) and 8 (C) h post-feeding. Numbers 1 to 4 correspond to individual sheep

4.3.4 Discussion

Alfalfa and grass hay were chosen because they are commonly used as a forage source in sheep feeding in the Mediterranean area. Moreover, they usually differ in fiber fermentation rate and extent in the rumen (Van Soest, 1994), thus promoting different microbial communities.

4.3.4.1 Ruminal fermentation

Differences between diets in ruminal parameters observed in our study reflect reported differences in chemical composition between legume and grasses (Van Soest, 1994). The greater NH₃-N levels found in sheep fed the AL diet may have been due to the higher N intake, but might also indicate higher protein degradation compared with GR diet. This hypothesis would be supported by the higher concentrations of other minor VFA observed with AL diet, because branched-chain VFA are derived from the fermentation of branched-chain aminoacids. For both diets, NH₃-N concentrations at all sampling times were above the minimum levels (50 mg NH₃-N/L; Slyter *et al.*, 1979) required to allow maximum growth of rumen microbes, indicating that N was not a limiting factor for microbial growth with any diet.

Whereas total VFA concentrations before feeding and at 8 h post-feeding were similar for both diets, sheep fed AL diet had greater concentrations at 4 h post-feeding compared with GR-fed sheep, which might be due to a higher degradation rate of AL diet. However, it should be noticed that VFA concentrations do not necessarily reflect VFA production and absorption rates.

Both CMCase and xylanase activities decreased after feeding, which might be partly related to changes in ruminal pH, as pH dropped from values higher than 6.60 before feeding to values below 6.30 at 4 h post-feeding and close to 6.50 at 8 h post-feeding (Table 4.3.3). According to an *in vitro* study (Stewart, 1977), optimum cellulolytic activity in the rumen fluid takes place at pH values above 6.7, and decreases drastically at pH below 6.3. However, the lack of correlation ($P=0.59$ and 0.71 for CMCase and xylanase, respectively; results not shown) between ruminal pH and fibrolytic activities in our study indicates that other factors were implied in the decrease of fibrolytic activities after feeding. Microbial attachment to fibrous substrates is an important prerequisite of fiber degradation in the rumen before microbes start to produce fibrolytic enzymes. This delay in the production of fibrolytic enzymes might explain the lower activities observed at 4 h post-

feeding, which is in agreement with the results of previous studies (Martin *et al.*, 1993; Giraldo *et al.*, 2008). The lower activity at 4 h might have also been due to the dilution effect of feed and water entering the rumen shortly after feeding, but this effect was not observed for amylase activity which remained unchanged over the feeding cycle with both diets. The lack of changes in the amylolytic activity during the feeding cycle suggests also that this activity was not affected by post-prandial changes in ruminal pH.

4.3.4.2 Microbial populations

Mean total DNA concentrations in ruminal fluid in our study (ranging from 2.06 to 3.34 µg per mL) were similar to those reported by Brodiscou *et al.* (1998) using different DNA extraction procedures in sheep fed a 44:66 forage:concentrate diet (values ranging from 2.61 to 3.95 µg per mL of ruminal fluid). In addition, the obtained absorbance ratios (from 1.72 to 2.00) were considered indicative of good purified DNA.

Total protozoa numbers determined by microscopic counting were in the range of those previously reported for sheep (Santra *et al.*, 1998; Brossard *et al.*, 2004) and Entodiniinae represented the most abundant type (averaged across diets: 92.3 and 91.8% for AL and GR diets, respectively). Postprandial changes in protozoa numbers were in accordance with the decrease of protozoa after feeding detected in other studies (Santra *et al.*, 1998; Brossard *et al.*, 2004), which has been mainly attributed to protozoa migration to colonize new feed particles and to the dilution of ruminal contents by feed, drinking water and saliva (Dehority, 2003), although others (Clarke *et al.*, 1982; Leedle *et al.*, 1982) have also pointed out the protozoal lysis associated with rising oxygen concentrations, decreased pH and overaccumulation of storage polysaccharide. In contrast, total protozoal DNA concentrations were not significantly affected by sampling time, although they decreased by 34 and 33% at 4 h post-feeding for diets AL and GR, respectively. Protozoal populations in the rumen have been classically determined by microscopic counting, but nowadays qPCR has been probed as a useful tool to quantify the amount of protozoal DNA in ruminal samples (Sylvester *et al.*, 2004, 2005). However, only few studies have compared the results obtained with the two techniques. In our study, protozoa numbers determined by microscopic counting were higher for AL compared with GR, but a trend to higher protozoal DNA concentrations with GR diet was observed when using qPCR, thus changing the interpretation of results. Moreover, results from both methods were not correlated, either when comparing all data

together ($n=24$; $r=0.12$; $P=0.58$) or independently for each diet ($n=12$; $r=0.33$ and $P=0.30$ for AL diet, and $r=0.15$ and $P=0.65$ for GR diet; results not shown). In agreement with our results, Tan *et al.* (2011) conducted an *in vitro* study and observed no significant correlation between protozoa numbers determined by microscopic counting and protozoal DNA concentrations assessed by qPCR using the same primers utilized in our study. In contrast, Skillman *et al.* (2006) observed a highly significant correlation between protozoa numbers in sheep determined by microscopic counting and protozoal DNA concentrations assessed by qPCR using primers specifically designed to target *Entodinium* and *Dasytricha* spp. Besides the different primers used in the cited studies, other reasons can justify the lack of correlation between both methods of assessing protozoal concentrations in the rumen. Lysed or ingested protozoa are not counted by microscopy and it is likely that temperature changes (39°C to ambient) during sampling and processing procedures may cause protozoa lysis and therefore underestimate protozoal populations (Skillman *et al.*, 2006); by contrast, the rapid freezing of samples for DNA extraction is likely to preserve DNA from lysed protozoal cells. Moreover, protozoal lysis may be more pronounced at short post-feeding times due to the low pH compared with longer post-prandial times, thus contributing to the lack of correlation between both methods of assessing protozoa concentrations. Finally, Firkins and Yu (2006) indicated that rumen protozoa probably change their rDNA copies per cell over their feeding cycle, which would also help to explain the lack of correlation between the results obtained by counting and qPCR.

The decrease in bacterial DNA concentration observed between 0 and 4 h post-feeding agrees well with previous studies in sheep (Martin *et al.*, 2001) and cattle (Leedle *et al.*, 1982) and it has been attributed to the dilution effect of ruminal contents by feed, water and saliva. Bacterial concentration is the balance between bacterial growth and lysis, dilution by feed and water, and turnover of particles, and all these factors are influenced by feed intake level and eating pattern. In our study, sheep were fed twice daily at a restricted level and consumed the offered feed within a short period of time after feeding (1-1.5 h), which probably contributed to a high dilution effect of rumen content. Leedle *et al.* (1982) also pointed out that passage of digested materials is increased after feeding and that changes of ruminal conditions (temperature, pH, osmotic pressure and entrance of oxygen) after feed ingestion may contribute to the decline in bacterial numbers.

The greater relative abundance of *F. succinogenes* and *R. flavefaciens* in GR-fed sheep in our study agrees well with the results of Huws *et al.* (2010) who reported greater concentrations of both cellulolytic species in the rumen fluid of steers fed grass silage than in steers fed red clover silage. In addition, Kong *et al.* (2012) reported greater concentrations of *R. flavefaciens* and *R. albus* in the rumen fluid of cows fed triticale than in cows fed alfalfa, although *F. succinogenes* concentrations were greater in the cows fed alfalfa. These results would indicate that relative concentrations of cellulolytic bacteria might differ between animal species and feeding conditions. The effect of diet on cellulolytic bacteria is also highlighted by the fact that the two most abundant cellulolytic bacteria were *F. succinogenes* and *R. albus* for AL diet, but were *F. succinogenes* and *R. flavefaciens* for GR diet. These results are in agreement with previous studies in which *F. succinogenes* was the most predominant in sheep rumen (Koike and Kobayashi, 2001; Michalet-Doreau *et al.*, 2002; Mosoni *et al.*, 2011) and cows fed alfalfa hay (Kong *et al.*, 2012).

Postprandial changes of the three cellulolytic bacteria differed with diet. In sheep fed AL diet, the relative abundance of *F. succinogenes* and *R. flavefaciens* remain fairly constant over the feeding cycle, whereas abundance of *R. albus* increased 2.1 times at 4 h post-feeding although differences did not reach the significance level due to the high variability among sheep. In contrast, the abundance of the three cellulolytic bacteria numerically increased at 4 h post-feeding with GR diet (2.7, 14.2 and 2.6 times for *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and *R. albus*, respectively). These values suggest that cellulolytic bacteria were stimulated by the arrival of fibrous feed to the rumen, but this effect may be influenced by the type of forage in the diet. A different response for each diet was also observed in the relative abundance of methanogenic archaea, which significantly decreased after feeding with AL diet and remained unchanged with GR diet. This difference between diets could not be related to ruminal pH, which was similar for both diets.

Rumen protozoa (through their indigenous cellulases or ingested bacterial enzymes) are considered to be responsible for a large portion of CMC_{ase}, xylanase and amylase activity of rumen fluid (Hristov *et al.*, 1999). In our study, xylanase activity was positively correlated with concentrations of protozoal DNA and numbers of both total protozoa and Entodiniinae. In addition a trend to a positive correlation was found between protozoal DNA concentrations and amylase activity, and between total protozoa and Entodiniinae numbers and CMC_{ase} activity. The lack of correlations between

total bacterial DNA and CMCase and amylase activities and the negative correlation with amylase activity is difficult to interpretate as ruminal bacteria are a complex and diverse population including microbes with a wide range of enzymatic activities.

The lack of significant correlations between the abundance of the three cellulolytic bacteria and the determined fibrolytic activities found in our study is in agreement with the results of Weimer *et al.* (1999) and Michalet-Doreau *et al.* (2002), who reported no correlation between the abundance of cellulolytic bacteria and fibrolytic activities or fermentation parameters in the rumen of cows and sheep, respectively. These authors pointed out that molecular techniques provide no information concerning viability, metabolic activity, or growth stage of the bacteria, all of which affect the production of enzymes and feed degradation. Moreover, it has to be into account that the determined enzymes are extracellular, and some of them may have been produced by microbes attached to feed particles.

4.3.4.3 Bacterial diversity

Several studies have analyzed the influence of the diet on bacterial diversity in the rumen, but results are contrasting. Whereas Larue *et al.* (2005) found that bacterial diversity was greater in sheep fed only hay compared with those receiving 60% hay and 30% of concentrate, Kocherginskaya *et al.* (2001) reported that feeding high-concentrate diets to sheep promoted a greater bacterial diversity in the rumen compared with feeding high-forage diets. In contrast, Julien *et al.* (2010) reported no differences in bacterial diversity in the rumen of cows fed four diets differing in forage:concentrate ratio. Our results indicate that feeding the AL diet promoted a greater bacterial diversity than feeding GR diet, and are in agreement with those of Huws *et al.* (2010), who found a greater number of bands in LAB samples from steers fed red clover silage compared with samples from steers receiving grass silage (33.7 *vs.* 27.0) although the differences did not reach the significance level.

Several studies have pointed out large variations in rumen bacterial diversity between animals (Weimer *et al.*, 1999; 2010; Julien *et al.*, 2010), and therefore a cross-over design was used in our study in order to reduce the inter-animal variability. For both diets, sheep 1 and 3 had lower ($P<0.01$) numbers of peaks (mean values across diets and sampling times of 42.0 and 40.8, respectively) and Shannon index (3.74 and 3.79, respectively) compared with sheep 2 and 4 (mean values across diets and sampling times for number

of peaks of 48.3 and 47.5, respectively, and for Shannon index 3.87 and 3.86, respectively). These results confirm previous studies (Li *et al.*, 2009; Welkie *et al.*, 2010; Petri *et al.*, 2012) which showed that individual host variation can be responsible for larger differences in ruminal bacterial diversity than those produced by contrasting diets or different sampling times, and highlight the importance of an appropriate experimental design for studies assessing ruminal microbial populations.

4.3.5 Conclusion

Concentrations of bacterial DNA in ruminal fluid of sheep were not affected by the type of forage in the diet, but protozoal DNA concentrations tended to be greater in sheep fed GR diet compared with AL-fed sheep. The type of forage also affected the relative abundance of *F. succinogenes* and *R. flavefaciens*, which were greater in GR-fed sheep. Postprandial changes in the concentrations of bacterial and protozoal DNA in ruminal fluid were similar for both high-forage diets, but changes in cellulolytic bacterial and fungal DNA differed between diets. Whereas AL-fed sheep fed showed relatively stable abundances of the determined cellulolytic bacteria and fungi, in GR-fed sheep the relative abundances of both groups increased at 4 h post-feeding and recovered initial values at 8 h post-feeding. Bacterial diversity was higher for AL compared with GR diet, and no forage × sampling time interactions were detected. The results indicate that the type of forage influence the structure of microbial communities in ruminal fluid from sheep. No significant correlations were found between protozoal numbers determined by microscopic counting and total protozoal DNA concentrations, which highlights the importance of the method used to determine protozoa concentrations in ruminal fluid. No correlations were found between fibrolytic activities and the relative abundance of the individual species of cellulolytic bacterial DNA, which could be due to the fact that qPCR technique provides no information concerning viability, metabolic activity, ribosomal numbers, or growth stage of the bacteria (Michalet-Doreau *et al.*, 2002).

Acknowledgements: Funding was provided by the Spanish CICYT (Projects AGL2008-04707-C02-02 and AGL2011-22628). C. Saro gratefully acknowledges the receipt of a scholarship from the MEC of Spain (AP 2006-03049).

4.3.6. References

- Association of Official Analytical Chemists. AOAC. 1999. *Official methods of analysis, 16th edition, 5th revision*. AOAC International, Gaithersburg, Madison, USA.
- Brossard, L., C. Martin, F. Chaucheyras-Durand, B. Michalet-Doreau. 2004. Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* 44: 195-206.
- Broudiscou, L., H. Geissler, A. Broudiscou. 1998. Estimation of the growth rate of mixed ruminal bacteria from short-term DNA radiolabeling. *Anaerobe* 4: 145-152.
- Clarke, R. T. J., M. J. Ulyatt, A. John. 1982. Variations in number and mass of ciliate protozoa in the rumens of sheep fed chaffed alfalfa (*Medicago sativa*). *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1201-1204.
- Danovaro, R., G. M. Luna, A. Dell'Anno, B. Pietrangeli. 2006. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5982-5989.
- Dehority, B. A. 2003. *Rumen microbiology*. Nottingham University Press. Nottingham, UK.
- Dehority, B. A. 1993. *Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Dehority, B. A., C. G. Orpin. 1997. Development of and natural fluctuations in rumen microbial populations, in: *The rumen microbial ecosystems*. Hobson, P. N., C. S. Stewart, ed. Blackie Academic & Professional, London, UK.
- Denman, S. E., C. S. McSweeney. 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., N. W. Tomkins, C. S. McSweeney. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 313-322.
- Denman, S. E., M. J. Nicholson, J. L. Brookman, M. K. Theodorou, C. S. McSweeney. 2008. Detection and monitoring of anaerobic rumen fungi using an ARISA method. *Lett. Appl. Microbiol.* 47: 492-499.
- Firkins, J. L., Z. Yu. 2006. Characterisation and quantification of the microbial populations of the rumen, in: *Ruminant physiology. digestion, metabolism and impact on nutrition on gene expression, immunology and stress*. Serjzen, K., T. Hevelplund, M. O. Nielsen, eds., Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Neatherlands.
- Firkins, J. L., S. K. R. Karnati, Z. Yu. 2008. Linking rumen function to animal response by application of metagenomics techniques. *Austr. J. Exp. Agric.* 48: 711-721.
- Garcia-Martinez, R., M. J. Ranilla, M. L. Tejido, M. D. Carro. 2005. Effects of disodium fumarate on *in vitro* rumen microbial growth, methane

- production and fermentation of diets differing in their forage:concentrate ratio. *Br. J. Nutr.* 94: 71-77.
- Giraldo, L. A., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, S. Ramos, M. D. Carro. 2008. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. *J. Anim. Sci.* 86: 1617-1623.
- Hristov, A. N., T. A. McAllister, K. J. Cheng. 1999. Effect of diet, digesta processing, freezing and extraction procedure on some polysaccharide-degrading activities of ruminal contents. *Can. J. Anim. Sci.* 79: 73-81.
- Huws, S. A., M. R. F. Lee, S. M. Muetzel, M. B. Scott, R. J. Wallace, N. D. Scollan. 2010. Forage type and fish oil cause shifts in rumen bacterial diversity. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73: 396-407.
- Julien, C., J. P. Marden, C. Bonnefont, R. Moncoulon, E. Auclair, V. Monteils, C. Bayourthe. 2010. Effects of varying proportions of concentrates on ruminal-reducing power and bacterial community structure in dry dairy cows fed hay-based diets. *Animal.* 4: 1641-1646.
- Kocherginskaya, S. A., R. I. Aminov, B. A. White. 2001. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe.* 7: 119-134.
- Koike, S., Y. Kobayashi. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 361-366.
- Kong, Y., Y. Xia, R. Seviour, M. He, T. McAllister, R. Forster. 2012. *In situ* identification of carboxymethyl cellulose-digesting bacteria in the rumen of cattle fed alfalfa or triticale. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80: 159-167.
- Larue R., Z. Yu, A. A. Parisi, A. R. Egan, M. Morrison. 2005. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and *rrs* gene sequencing. *Environ. Microbiol.* 7: 530-543.
- Leedle, J. A., M. P. Bryant, R. B. Hespell. 1982. Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low- or high-forage diets. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 402-412.
- Li, M., G. B. Penner, E. Hernandez-Sanabria, M. Oba, L. L. Guan. 2009. Effects of sampling location and time, and host animal on assessment of bacterial diversity and fermentation parameters in the bovine rumen. *J. Appl. Microbiol.* 107: 1924-1934.
- Martin, C., B. Michalet-Doreau, G. Fonty, A. Williams. 1993. Postprandial variations in the activity of polysaccharide-degrading enzymes of fluid- and particle-associated ruminal microbial populations. *Curr. Microbiol.* 27: 223-228.
- Martin, C., L. Millet, G. Fonty, B. Michalet-Doreau. 2001. Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community associated with rumen solid digesta. *Reprod. Nutr. Dev.* 41: 413-424.

- McSweeney, C. S., S. E. Denman, A. D. G. Wright, Z. Yu. 2007. Application of recent DNA/RNA-based techniques in rumen ecology. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20: 283-294.
- Michalet-Doreau, B., I. Fernandez, G. Fonty. 2002. A comparison of enzymatic and molecular approaches to characterize the cellulolytic microbial ecosystems of the rumen and the cecum. *J. Anim. Sci.* 80: 790-796.
- Mosoni, P., F. Chaucheyras-Durand, C. Béra-Maillet, E. Forano. 2007. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: Effect of a yeast additive. *J. Appl. Microbiol.* 103: 2676-2685.
- Mosoni, P., C. Martin, E. Forano, D. P. Morgavi. 2011. Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.* 89(3): 783-791.
- NRC (National Research Council). Committee on the nutrient requirements of small ruminants. 2007. *Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids*. The National Academies Press, Washington DC, USA.
- Ogimoto, K., S. Imain. 1981. Rumen bacteria, in: *Atlas of rumen microbiology*. Japan Society Press, Japan.
- Petri, R. M., R. J. Forster, W. Yang, J. J. McKinnon, T. A. McAllister. 2012. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. *J. Appl. Microbiol.* (In press).
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* 29: e45.
- Ramos, S., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, M. E. Martínez, C. Saro, M. D. Carro. 2009. Influence of detachment procedure and diet on recovery of solid-associated bacteria from sheep ruminal digesta and representativeness of bacterial isolates as assessed by automated ribosomal intergenic spacer analysis-polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* 92: 5659-5668.
- Santra, A., S. A. Karim, A. S. Mishra, O. H. Chaturvedi, R. Prasad. 1998. Rumen ciliate protozoa and fibre utilization in sheep and goats. *Small Rumin. Res.* 30: 13-18.
- Shannon, C. E., W. Weaver. 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press. Urbana, Illinois, USA.
- Skillman, L. C., A. F. Toovey, A. J. Williams, A. D. Wright. 2006. Development and validation of a real-time PCR method to quantify rumen protozoa and examination of variability between entodinium populations in sheep offered a hay-based diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 200-206.
- Slyter, L. L., L. D. Satter, D. A. Dinius. 1979. Effect of ruminal ammonia concentration on nitrogen utilization by steers. *J. Anim. Sci.* 48: 906-912.
- Stewart, C. S. 1977. Factors affecting the cellulolytic activity of rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 497-502.

- Sundset, M. A., J. E. Edwards, Y. F. Cheng, R. S. Senosiain, M. N. Fraile, K. S. Northwood, K. E. Praesteng, T. Glad, S. D. Mathiesen, A. D. Wright. 2009. Molecular diversity of the rumen microbiome of Norwegian reindeer on natural summer pasture. *Microb. Ecol.* 57: 335-48.
- Sylvester, J. T., S. K. R. Karnati, Z. Yu, M. Morrison, J. L. Firkins. 2004. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. *J. Nutr.* 134: 3378-3384.
- Sylvester, J. T., S. K. R. Karnati, Z. Yu, C. J. Newbold, J. L. Firkins. 2005. Evaluation of a real-time PCR assay quantifying the ruminal pool size and duodenal flow of protozoal nitrogen. *J. Dairy Sci.* 88: 2083-2095.
- Tajima, K., R. I. Aminov, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura, Y. Benno. 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl. Environm. Microbiol.* 67: 2766-2774.
- Tan, H. Y., C. C. Sieo, N. Abdullah, J. B. Liang, X. D. Huang, Y. W. Ho. 2011. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 169: 185-193.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell University Press. Ithaca, New York, USA.
- Wanapat, M., A. Cherdthong. 2009. Use of real-time PCR technique in studying rumen cellulolytic bacteria population as affected by level of roughage in swamp buffalo. *Curr. Microbiol.* 58: 294-299.
- Weimer, P. J., G. C. Waghorn, C. L. Odt, D. R. Mertens. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 122-134.
- Weimer, P. J., D. M. Stevenson, D. R. Mertens. 2010. Shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat-depressing conditions. *J. Dairy Sci.* 93: 265-278.
- Welkie, D. G., D. M. Stevenson, P. J. Weimer. 2010. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe.* 16: 94-100.
- Yu, Z., M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques.* 36: 808-812.

4.4 PRUEBA 4

**COMPARISON OF AUTOMATED RIBOSOMAL
INTERGENIC SPACER ANALYSIS (ARISA) AND
DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS
(DGGE) TO CHARACTERIZE BACTERIAL DIVERSITY
IN THE RUMEN OF SHEEP FED TWO
DIFFERENT FORAGES**

**COMPARISON OF AUTOMATED RIBOSOMAL
INTERGENIC SPACER ANALYSIS (ARISA) AND
DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS
(DGGE) TO CHARACTERIZE BACTERIAL DIVERSITY
IN THE RUMEN OF SHEEP FED TWO
DIFFERENT FORAGES**

C. Saro¹, M. J. Ranilla¹, A. Cifuentes², R. Rosselló-Mora² and
M. D. Carro¹

¹Departamento de Producción Animal. Universidad de León. 24071 León,
Spain. Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n.
24346 Grulleros, León, Spain

²IMEDEA. Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (CSIC-UIB).
C/ Miquel Marqués, 21. 07190 Esporles, Illes Balears, Spain

FEMS Microbiology Ecology (en evaluación)

Comparison of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize bacterial diversity in the rumen of sheep fed two different forages

Automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) are two of the most widely used techniques to assess microbial diversity. The aim of this study was to investigate the postprandial changes in bacterial communities in the solid and liquid phases of the rumen in sheep fed two different forages by using ARISA and DGGE. Four rumen-fistulated sheep were used in a cross-over design. The two experimental diets had 70:30 forage:concentrate ratio with either alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as forage. Samples from the solid and liquid phases of the rumen were obtained from each sheep immediately before feeding (0 h) and 4 and 8 h post-feeding. With ARISA, mean values of total number of peaks ranged from 20.0 to 50.8 for solid, and from 38.5 to 52.0 for liquid samples. With DGGE, mean values of total number of bands ranged from 9.0 to 12.8 for solid, and from 8.8 to 14.3 for liquid. Values of Shannon index ranged between 2.99 and 3.95 with ARISA, and between 2.11 and 2.61 with DGGE. Whereas no variations ($P>0.05$) in bacterial diversity over the postprandial period were detected either in solid or liquid with DGGE for any diet, ARISA showed a decrease ($P<0.05$) in the number of peaks in solid samples at 4 h post-feeding compared with 0 and 8 h samplings. In liquid samples, the number of peaks was lower ($P<0.05$) at 4 h post-feeding than that before feeding in GR-fed sheep, but no differences ($P=0.14$) were observed for AL diet. Both techniques detected similar differences between forages, with AL diet promoting a greater number of peaks/bands and Shannon index values than the GR diet in both solid and liquid samples. Despite of the lower number of bands detected by DGGE compared with ARISA, it showed a clear discrimination among solid and liquid samples when dendrograms were constructed individually for each sheep. On the whole, ARISA was shown to be less time-consuming than DGGE, and therefore more appropriate for the rapid analysis of a large number of samples. The results indicate that DGGE can detect major shifts in bacterial populations, but it might be not sensible enough to detect subtler changes in rumen bacterial communities.

Key words: bacterial diversity, sheep, ARISA, DGGE

4.4.1 Introduction

Microbiota in the rumen is one of the most studied gastrointestinal systems, and until recently it has been studied by methods based on various cultivation techniques; however, limitations imposed by these techniques have precluded a complete knowledge of the ecosystem. In the last years several molecular fingerprinting techniques have been used to assess the diversity of rumen microbial communities, the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) being two of the most widely used. The DGGE uses the differences in the nucleotides sequence in the DNA to separate 16S rRNA gene fragments based on distinct melting properties (Hori *et al.*, 2006). This gel-based method is particularly useful for the identification of the numerically dominating community members (Lindström and Leskinen, 2002). Several studies have shown the efficiency of DGGE to detect shifts in rumen microbial communities produced by feeding different diets (Sadet *et al.*, 2007; Sadet-Bourgeteau *et al.*, 2010; Kongmun *et al.*, 2011; Huws *et al.*, 2010), defaunation (Morgavi *et al.*, 2006) or as a response to photoperiod (McEwan *et al.*, 2005). The ARISA is based on the analysis of intergenic 16S-23S internally transcribed spacer sequences within the rDNA operon, and was first developed to assess microbial structure in freshwater (Fisher and Triplett, 1999). More recently, ARISA has been used to analyze other ecological systems, including the rumen (Denman *et al.*, 2008; Sundset *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2009a; Palmonari *et al.*, 2010; Weimer *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2010). However, to our knowledge there has been no proper comparison between the efficacies of DGGE and ARISA in the examination of microbial communities in the rumen.

In general, the composition of the rumen microbial communities is known to be highly responsive to changes in diet, age, antibiotic use and health of the host animal, and can even vary according to geographical location and season (Kocherginskaya *et al.*, 2001), but the diet fed to the host animal is one of the most relevant factors. Several studies have established that ruminal microbial communities change with different forage to concentrate ratios in the diet (Kocherginskaya *et al.*, 2001; Julien *et al.*, 2010), but there is little information about the changes produced by feeding diets with different types of forage, and it is limited to cattle (Kong *et al.*, 2010; Pitta *et al.*, 2010). The nature of forages, as well as the physico-chemical changes induced by their fermentation in the rumen, are known to influence the development of certain functional microbes in the rumen (Martin *et al.*,

2002), but its influence on bacterial diversity in the rumen has received less attention. Moreover, irrespective of diet, rumen microbial community also fluctuates during the postprandial period, as feed fermentation determines changes in pH, fermentation products, and substrate availability for microorganisms. A better understanding of the influence of forage source on bacterial diversity in the rumen of sheep would be of great interest, as high-forage diets are widely used in sheep practical feeding in many areas of the world.

In this study, we investigated whether ARISA and DGGE provided the same information regarding the changes in bacterial diversity during the feeding cycle in the solid and liquid phases of the rumen in sheep fed two diets differing in forage source. Alfalfa hay and grass hay were chosen as forage source because they are commonly used in sheep feeding, differ in composition and tissue anatomy, and therefore may differ in fiber fermentation rate and extent in the rumen and promote different bacterial communities.

4.4.2 Materials and methods

4.4.2.1 Diets, animals, experimental design, and sample collection

Two total mixed diets were formulated following the NRC (2007) guidelines. The diets had forage:concentrate ratio (dry matter (DM) basis) of 70:30 with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as forage source, and were prepared and chemically analysed as described by Ramos *et al.* (2009b). The forages were chosen to be representative of those used currently in sheep practical feeding. The alfalfa hay contained 2.67, 46.6 and 33.1% of nitrogen, neutral detergent fiber and acid detergent fiber, respectively, whereas the grass hay contained 1.46, 56.9 and 28.6% of nitrogen, neutral detergent fiber and acid detergent fiber, respectively. The AL diet had higher nitrogen, but lower neutral detergent fiber and acid detergent fiber content (2.69, 42.6 and 26.9%, respectively) compared with the GR diet (1.94, 49.9 and 23.8%, respectively). All contents are given in dry matter basis.

All animal procedures were conducted in accordance with the Spanish Animal Care Regulations, and the experimental protocols were approved by the León University Institutional Animal Care and Use Committee. Four Merino sheep (58.3 ± 3.27 kg live weight), fitted with a rumen cannula, were housed in individual pens and had continuous access to fresh water and vitamin/mineral block over the trial. Diets were offered to the animals twice daily (08:00 and 20:00 hours) at a daily rate of 52 g of dry

matter /kg body weight^{0.75} to minimize feed selection. Feed refusals, if any, were collected at 08:00 hours.

Statistical design was a cross-over design with 2 experimental periods of 24 days each. Each experimental period consisted of 21 days of dietary adaptation and 3 days for sample collection. On days 22 and 24 of each period, ruminal content from each sheep was sampled immediately before the morning feeding (0 hours) and at 4 and 8 hours after feeding. Samples (mix of liquid and solid) from the dorsal, central and ventral regions of the rumen were collected with a pair of tongs inserted through the rumen cannula to form one composited sample (about 500 g) for each sheep at each sampling time. Ruminal content was strained through 2 layers of cheesecloth, and the solid content was thoroughly mixed before sampling. About 100 g of solid and 20 mL of fluid were placed in independent sterile containers and stored frozen at -80°C until DNA extraction. Within each experimental period, the 2 samples taken on the 2 sampling days for each sheep at each sampling time were composited before analysis. Within each period there were 3 samples per sheep (one for each sampling time) for bacterial diversity analyses.

4.4.2.2 DNA extraction

Solid samples were freeze-dried and homogenized with a mortar and pestle to a fine power before DNA extraction. Liquid samples were centrifuged (4 mL, 20 000 g, 5 min, 4°C), the supernatant discarded, and the pellets used for DNA extraction. DNA was extracted separately from solid samples (120 mg) and centrifuged ruminal fluid after mechanical disruption of microorganisms with a MiniBeadbeater (3 min; Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) in the presence of 4% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 500 mM NaCl, and 50 mM EDTA. Samples were then centrifuged (16 000 g, 5 min, 4°C), and DNA was extracted from the supernatant using the QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). The extraction protocol followed the procedure described by Yu and Morrison (2004), with the exception that an additional step involving the treatment of samples with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was included to remove PCR inhibitors. DNA extraction was carried out in duplicate, and eluted DNA was pooled and mixed before quantification and PCR. Eluted mixed DNA was quantified using a Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, DE, USA) at a wavelength of 260 nm.

4.4.2.3 Analysis of bacterial communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA)

Extracted DNA was amplified using universal bacterial primers 16S-1392F and 23S-125R (Danovaro *et al.*, 2006; synthesized by Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, Spain), which amplify the ITS1 region in the rRNA operon plus ca. 282 bases of the 16S and 23S RNAs. Primer 23S-125R was fluorescently labelled with the phosphoramidite dye 6-FAM. Each PCR mix (50 μ L final volume) contained 1 x PCR reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 μ M of each primer, each deoxynucleotidetriphosphate at a concentration of 0.2 mM, and 2.5 U of Taq Polymerase (Biotools B&M Labs SA, Madrid, Spain). Thermocycling was conducted in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), and started with an initial cycle of denaturation (94°C for 3 min), followed by 30 cycles of denaturation (94°C for 60 s), annealing (55°C for 60 s) and elongation (72°C for 120 s), and ending with a final extension step at 72°C for 2 min. The PCR products were analysed for quality by electrophoresis in 1.5% agarose gels.

The ARISA technique was performed as described by Ramos *et al.* (2009a). Briefly, for each ARISA about 5 ng of amplicons were mixed with an internal size standard (GS 1200 LIZ, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in deionized formamide, then denatured at 94°C for 2 min, and immediately chilled on ice. Automated detection of ARISA fragments was carried out using an ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with 36-cm by 50- μ m capillary and POP-7 polymer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Peak size and area were estimated by comparison with the internal size standard using the GeneMaker Software v1.80 (SoftGenetics, State College, PA, USA). To include the maximum number of peaks while excluding background fluorescence, a threshold of 100 fluorescence units was used.

4.4.2.4 Analysis of bacterial communities by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

Fragments of the 16S ribosomal DNA (rDNA) suitable for DGGE analysis were obtained by using the primer combination GM5-clamp/907r for bacteria and the PCR conditions described previously by Muyzer *et al.* (1993). The PCR mixture (25 μ L) contained 10x PCR buffer, 2 μ L of dNTP mix (25 mM each), 0.5 of each primer (10 μ M) and 0.125 μ L of Taq polymerase (5 units/ μ L; TAKARA Ex Taq, Takara Bio Inc). PCR started with an initial step of 5 min at 94°C followed by 20 cycles of 94°C for 1 min, 1 min at

annealing temperature that was lowered from 65°C to 55°C, 0,5°C every cycle and 3 min at 72°C. After that 10 cycles at 55°C for the annealing were carried out, a final extension of 30 min at 72°C was performed. Amplification products were analyzed first by electrophoresis in 1.5% (wt/v) agarose gels and then by ethidium bromide staining. In order to avoid heteroduplex formation the amplified reaction was diluted 10-fold into fresh reaction mixture of the same composition and cycled five times using the parameters specified above and the annealing temperature at 55°C (Thompson *et al.*, 2002). The size and quality of the resulting PCR products was confirmed by electrophoresis in agarose gel.

DGGE was performed with the Bio-Rad DCode system. Ten µL of sample were charged onto 6% polyacrylamide gel with gradient which were formed with 8% (wt/v) acrylamide stock solutions and which contained 20 and 60% denaturant (7M urea and 40% (v/v) formamide deionized with resin. Electrophoresis was performed at a constant voltage of 100 V and a temperature of 60°C during 18 hours. After electrophoresis gel was stained with SYBR Gold and photographed with UV transillumination. Because it was impossible to run all 48 samples in one gel, 4 different gels were run. All samples from the same sheep were loaded in the same gel to support the interpretation of the bands and analysis of experimental treatments (diet and sampling times).

4.4.2.5 Statistical analyses

It was considered that the peak profile in ARISA electropherograms and the band pattern in DGGE gel images reflect the predominant bacterial species or populations present in the rumen, and only the presence/absence of the different peaks/bands was considered for the analysis. The Shannon diversity index (Shannon and Weaver, 1949) was used to evaluate the diversity of bacterial communities. Dendrograms were constructed using the Pearson product-moment correlation coefficient and unweighted pair-group method (UPGMA) using the MVSP v3.12d software (Kovach Computing Service, Anglesey, Wales, UK). For both techniques, dendrograms were constructed separately for each sheep.

Data on the number of peaks/bands and Shannon index were analyzed independently for each technique as a mixed model with repeated measures using the PROC MIXED of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). The statistical model used included forage, period, time, and forage × time as fixed effects, and sheep as a random effect. Student's t test for paired

samples was used to compare the number of bands and Shannon index values in solid and liquid samples for each forage and sampling time. Effects were declared significant at $P < 0.05$, and $P < 0.10$ was considered a trend.

Table 4.4.1: Postprandial evolution of values of number of peaks and bands and Shannon index in solid ruminal digesta from sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR assessed either by ARISA or DGGE and similarity index of profiles between AL and GR samples from the same sheep ($n=4$)

| | Time after feeding (h) | | | | P value | | |
|---------------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------|---------|--------|------------|
| | 0 | 4 | 8 | SEM | FOR | Time | FOR x Time |
| ARISA | | | | | | | |
| Number of peaks | | | | | | | |
| AL | 50.8 ^b | 33.3 ^a | 50.0 ^b | 3.75 | 0.004 | <0.001 | 0.28 |
| GR | 45.5 ^b | 20.0 ^a | 41.3 ^b | | | | |
| Shannon index | | | | | | | |
| AL | 3.91 | 3.62 | 3.89 | 0.095 | <0.001 | <0.001 | 0.05 |
| GR | 3.78 ^b | 2.99 ^a | 3.66 ^b | | | | |
| Similarity index, % | | | | | | | |
| AL-GR | 51.2 ^b | 40.7 ^a | 54.9 ^b | 3.49 | - | 0.04 | - |
| DGGE | | | | | | | |
| Number of bands | | | | | | | |
| AL | 12.8 | 12.5 | 11.0 | 1.15 | 0.03 | 0.46 | 0.84 |
| GR | 9.5 | 10.4 | 9.0 | | | | |
| Shannon index | | | | | | | |
| AL | 2.53 | 2.51 | 2.39 | 0.115 | 0.02 | 0.52 | 0.90 |
| GR | 2.21 | 2.30 | 2.15 | | | | |
| Similarity index, % | | | | | | | |
| AL-GR | 49.9 | 52.0 | 55.2 | 8.21 | - | 0.49 | - |

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

4.4.3 Results and discussion

The number of peaks in the ARISA electropherograms of individual samples ranged from 19 to 61, whereas the number of bands in the DGGE ranged from 6 to 18. The Shannon index was used to estimate bacterial species diversity, and mean values for the experimental treatments ranged between 2.99 and 3.83 with ARISA and between 2.11 and 2.61 with DGGE. The ARISA profiling produced numbers of peaks in the range of those previously reported in ruminal samples from cows (Weimer *et al.*, 2010; Welkie *et al.*, 2010) and sheep (Ramos *et al.*, 2009a; Martínez *et al.*, 2010). Although most of the studies using DGGE for rumen bacterial profiling do not report information on the number of bands, our values are similar to the total of 11 and 12 bands detected by Kocherginskaya *et al.* (2001) in ruminal samples from steers fed grass hay or a corn-based diet, respectively. More recently, Petri *et al.* (2012) reported mean values of 27.4 and 29.5 bands in DGGE-gels of ruminal fluid samples from heifers fed a high-concentrate and a high-concentrate without forage diet, respectively.

The postprandrial evolution of number of bands/peaks and values of Shannon index in ruminal solid digesta and fluid assessed by ARISA and DGGE is shown in Tables 4.4.1 and 4.4.2, respectively. Because the main objective of the present study was to assess the ability of both techniques to detect similar changes in rumen bacterial communities, the effects of forage type and sampling time were analyzed independently for each technique. Samples from AL-fed sheep had more peaks in the ARISA electropherograms ($P=0.004$) and more bands in DGGE gels ($P=0.03$) compared with those from sheep fed the GR diet, which would indicate a greater bacterial diversity promoted by AL diet. Shannon index values were also greater in AL-fed sheep than in sheep fed the GR diet with both ARISA ($P<0.001$) and DGGE ($P=0.02$). These results clearly indicate that bacterial diversity in the rumen solid digesta was affected by forage type. This is in agreement with the results of Koike *et al.* (2003), who observed that the set of bacteria isolated from orchardgrass were different from the set isolated from alfalfa when samples of both forages were incubated *in sacco* in the rumen of sheep and bacterial 16S rDNA was cloned. More recently, Pitta *et al.* (2010) observed that feeding bermudagrass hay to steers promoted greater bacterial diversity in the solid ruminal digesta compared with winter wheat forage. Differences in bacterial diversity would indicate an adaptation of ruminal bacteria in response to the physicochemical composition of each forage. Similar differences between forages were observed in the ruminal fluid, with

samples from AL-fed sheep having greater number of peaks ($P=0.02$), number of bands ($P=0.01$) and Shannon index ($P=0.03$ and 0.008 for ARISA and DGGE, respectively) compared with samples from sheep fed GR diet (Table 4.4.2). Similarly, Pitta *et al.* (2010) observed a higher bacterial diversity in the rumen fluid of steers when they were fed bermudagrass hay compared with that from steers fed winter wheat forage.

Table 4.4.2: Postprandial evolution of values of number of peaks and bands and Shannon index in ruminal fluid from sheep fed 70:30 forage (FOR):concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR assessed either by ARISA or DGGE and similarity index profiles between AL and GR samples from the same sheep ($n=4$)

| | | | | SEM | P value | | |
|---------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------|---------|------|------------|
| | 0 h | 4 h | 8 h | | FOR | Time | FOR x Time |
| ARISA | | | | | | | |
| Number of peaks | | | | | | | |
| AL | 52.0 ^b | 46.3 ^{ab} | 44.0 ^a | 2.57 | 0.02 | 0.03 | 0.62 |
| GR | 46.0 ^b | 38.5 ^a | 41.3 ^{ab} | | | | |
| Shannon index | | | | | | | |
| AL | 3.95 ^b | 3.82 ^{ab} | 3.77 ^a | 0.061 | 0.03 | 0.04 | 0.67 |
| GR | 3.83 ^b | 3.65 ^a | 3.70 ^{ab} | | | | |
| Similarity index, % | | | | | | | |
| AL-GR | 46.2 | 49.0 | 45.2 | 5.07 | - | 0.86 | - |
| DGGE | | | | | | | |
| Number of bands | | | | | | | |
| AL | 14.3 | 13.8 | 13.5 | 1.27 | 0.01 | 0.45 | 0.20 |
| GR | 8.8 | 11.3 | 12.8 | | | | |
| Shannon index | | | | | | | |
| AL | 2.61 | 2.54 | 2.57 | 0.100 | 0.008 | 0.27 | 0.14 |
| GR | 2.11 | 2.38 | 2.48 | | | | |
| Similarity index, % | | | | | | | |
| AL-GR | 50.7 | 55.4 | 55.6 | 3.44 | - | 0.55 | - |

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

Although it is well known that rumen microbial communities vary with the time after feeding in response to changes in ruminal conditions

produced by feed intake and fermentation, only few studies have analyzed the postprandial evolution of bacterial diversity, and all of them have been conducted in cattle (Li *et al.*, 2009; Welkie *et al.*, 2010). When solid digesta samples were analyzed by ARISA, sampling time affected ($P < 0.001$) both the number of peaks and Shannon index, but DGGE analysis did not detect any effect of time ($P = 0.46$ and 0.52 for number of bands and Shannon index, respectively). With ARISA analysis, bacterial diversity decreased ($P < 0.05$) at 4 hours post-feeding and recovered before feeding values at 8 hours post-feeding for both diets. Similar results were also observed in the ruminal fluid. Whereas ARISA analysis detected changes in bacterial diversity over the feeding cycle ($P = 0.03$ and 0.04 for number of peaks and Shannon index, respectively), no variations with time were identified with DGGE analysis ($P = 0.45$ and 0.27 , respectively). For both diets, bacterial diversity assessed by ARISA numerically decreased after feeding, although differences with samples taken before feeding only reached the significance level ($P < 0.05$) in the samples taken at 8 hours post-feeding for AL diet and at 4 hours post-feeding for GR diet. In agreement with our results and using DGGE to analyze bacterial diversity in the rumen of cows, Li *et al.* (2009) found no differences among samples collected at different time points relative to feeding (-3, +3 and 9 hours), although fermentation parameters and the concentration of some individual bacterial species were significantly affected by sampling time. These authors suggested that bacteria may be different at group level, not species level. On the other hand, Welkie *et al.* (2010) used ARISA to monitor ruminal bacteria community dynamics (samples taken at 0, 2, 4, 6, 9 and 12 hours post-feeding) in two dairy cows and found differences both in solid and liquid-associated bacterial community composition over the feeding cycle. As stated before, there are no previous studies comparing DGGE and ARISA fingerprinting in ruminal samples, but our results would indicate ARISA technique is particularly well suited to detecting subtle changes in rumen bacterial communities, as previously pointed out by Welkie *et al.* (2010). On the contrary, DGGE analysis did not detect changes over time. These results indicate higher bacterial diversity coverage of ARISA compared with DGGE, as it has been previously reported by others after using both techniques to analyze microbial diversity in samples from different ecosystems (Crosby and Criddle, 2003; Cherif *et al.*, 2008; Okubo and Sugiyama, 2009). It seems that biodiversity measured with DGGE should be interpreted with caution, as there is a limit in the number of bands that can be visualized in a gel, although it seems clear that DGGE

reflects the most dominant taxa (Lindström and Leskinen, 2002; Loisel *et al.*, 2006).

The number of peaks obtained with ARISA was numerically higher than that of bands obtained with DGGE for all experimental treatments. In accordance with these results, Cherif *et al.* (2008) and Okubo and Sugiyama (2009) used both techniques to analyze bacterial and fungal diversity, respectively, in soil samples, and reported a higher number of ARISA peaks compared with DGGE bands. It is well known that in DGGE, only dominant species will hold sufficient amounts of original 16 rRNA copies to eventually show up as bands in a gel, and therefore it exhibits a limited sensitivity of detection for some less abundant community members (Moeseneder *et al.*, 1999; Reche *et al.*, 2005). Furthermore, the greater number of peaks revealed by ARISA probably reflects the higher resolution of capillary electrophoresis and the greater sensitivity of detection of the fluorescently labeled PCR products, compared with DGGE (Talbot *et al.*, 2008). In our study, values of Shannon index obtained by ARISA were numerically higher than those obtained by DGGE for all experimental treatments, which is consistent with the higher number of peaks detected by ARISA compared with the number of bands in DGGE gels.

Several studies have pointed out large variations in rumen bacterial diversity between animals (Li *et al.*, 2009; Weimer *et al.*, 1999; 2010; Julien *et al.*, 2010), and therefore a cross-over design was used in our study in order to reduce the inter-animal variability. With DGGE, a total of 34, 27, 27 and 33 bands were detected in the gels for sheep 1, 2, 3 and 4, respectively. With ARISA, a total of 120, 116, 117 and 127 peaks were detected in samples from sheep 1, 2, 3 and 4, respectively. When using ARISA to analyse solid digesta samples, sheep 2 had lower ($P<0.01$) numbers of peaks (mean value across diets and sampling times of 31.7) and Shannon index (3.42) compared with sheep 1 (47.5 and 3.78), 3 (42.8 and 3.71), and 4 (41.3 and 3.66). In the ruminal fluid samples analysed by ARISA, sheep 1 and 3 had lower ($P<0.01$) numbers of peaks (mean values across diets and sampling times of 42.0 and 40.8, respectively) and Shannon index (3.74 and 3.79, respectively) compared with sheep 2 and 4 (number of peaks of 48.3 and 47.5, respectively, and values of Shannon index of 3.87 and 3.86, respectively) for both diets. These results confirm previous studies (Li *et al.*, 2009; Welkie *et al.*, 2010; Petri *et al.*, 2012) which showed that individual host variation can be responsible for larger differences in ruminal bacterial diversity than those produced by contrasting diets or different sampling times, and highlight the importance of an

appropriate experimental design for studies assessing ruminal microbial populations. However, when using DGGE in solid digesta samples, no differences ($P>0.05$) between sheep were detected either in the number of bands (11.7, 10.3, 10.8 and 10.1 for sheep 1, 2, 3 and 4, respectively) or Shannon index values (2.44, 2.31, 2.35 and 2.23). In samples of ruminal fluid analysed by DGGE, sheep 3 had lower ($P<0.05$) number of bands and Shannon index values (7.3 and 1.97, respectively) compared with sheep 1 (13.8 and 2.62), 2 (13.0 and 2.49) and 4 (15.3 and 2.70). These results indicate that DGGE detected fewer differences in bacterial diversity among individual animals compared with ARISA.

When all samples were analyzed together by ARISA, 78% of the peaks detected in the solid phase of the rumen of sheep fed alfalfa were also detected at least in one sample when sheep were fed grass hay. In the liquid phase of the rumen, 84% of the peaks were detected in at least one sample from sheep fed any of the diets. However, greater differences in ruminal bacterial diversity between animals fed different forages have been reported by others. Kong *et al.* (2010) reported that 84% of the species in the bacterial community in cows fed alfalfa hay were different from those in the community in cows fed triticale straw, and the species richness of the community with alfalfa hay was 1.6 times of that of the community with triticale straw. The authors attributed the differences to the greater content and complexity of nutrients in alfalfa hay as compared with the relatively restricted nutrient content of triticale straw. Alfalfa hay nitrogen content was 6.5 times of that in triticale straw, and neutral detergent fiber content was 0.27 times of that in triticale straw. In our study there were fewer differences between diets, as nitrogen and neutral detergent content of the diet with alfalfa hay was 1.39 and 0.85 times of that with grass hay, respectively. Moreover, in the study of Kong *et al.* (2010) rumen content was sampled only before the morning feeding, and in our study samples were taken at different times throughout the feeding cycle, thus covering a wider range of bacterial communities.

A high number of peaks/bands were detected in both the solid and the liquid samples. In the ARISA analysis, the percentage of peaks found in at least one sample of each ruminal phase (solid or liquid) was 73, 64, 69 and 76% for sheep 1, 2, 3 and 4, respectively. With DGGE, the percentage of bands found in at least one sample of each ruminal phase was 68, 74, 67 and 64% for sheep 1, 2, 3 and 4, respectively. Similarly, Welkie *et al.* (2010) analyzed by ARISA the bacterial diversity in the rumen of two cows fed the

same diet, and reported that 63% of the 155 peaks detected in total were at least in one sample of solid and liquid phase of the rumen. These results would indicate that some bacterial communities can be found in both phases of the rumen, but others are found only in one phase.

Table 4.4.3: P-values of the Student's- *t* test comparing the number of peaks/bands and Shannon index values in ruminal solid digesta with those in ruminal fluid from sheep fed 70:30 forage:concentrate diets with alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as forage and assessed either by ARISA or DGGE

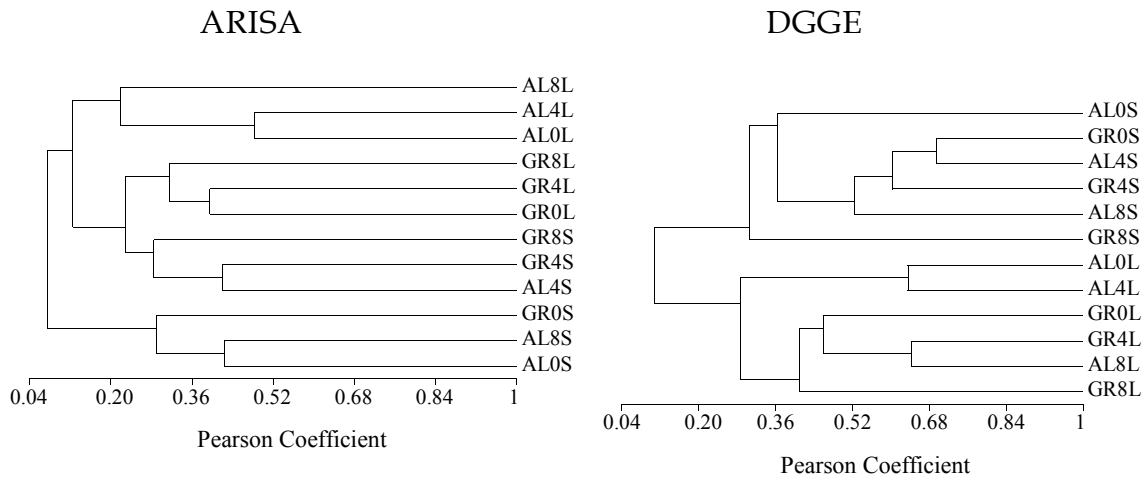
| | Time after feeding (hours) | | |
|-----------------|----------------------------|-------|------|
| | 0 | 4 | 8 |
| ARISA | | | |
| Number of peaks | | | |
| AL | 0.88 | 0.07 | 0.43 |
| GR | 0.95 | 0.002 | 0.99 |
| Shannon index | | | |
| AL | 0.83 | 0.06 | 0.45 |
| GR | 0.76 | 0.002 | 0.87 |
| DGGE | | | |
| Number of bands | | | |
| AL | 0.59 | 0.69 | 0.37 |
| GR | 0.73 | 0.68 | 0.42 |
| Shannon index | | | |
| AL | 0.73 | 0.91 | 0.39 |
| GR | 0.57 | 0.73 | 0.44 |

In order to analyze the similarity in bacterial diversity between the solid and liquid phases of the rumen, a paired Student's *t*-test was carried out within each technique (ARISA and DGGE) for each diet and sampling time, and the resulting *P*-values are shown in Table 4.4.3. With ARISA, no differences ($P=0.43$ to 0.99) between samples from the solid and those from the liquid phase of the rumen were found either in the number of peaks or in Shannon index values at 0 and 8 hours post-feeding, but solid digesta samples taken at 4 hours after feeding had lower ($P=0.002$) peak numbers and Shannon index values than those from the liquid phase for GR diet, and a trend to similar differences ($P=0.07$ and 0.06 for peak numbers and Shannon index, respectively) was observed with AL diet. In contrast, no

differences ($P=0.37$ to 0.91) between samples taken from the two phases of the rumen were detected by DGGE analysis. Other studies have reported differences between bacterial communities in the solid and liquid phases of the rumen in cattle (Welkie *et al.*, 2010; Huws *et al.*, 2010; Pitta *et al.*, 2010), and Larue *et al.* (2005) detected a trend ($P=0.09$) to greater peak numbers in the solid compared with the liquid phase of the rumen of sheep fed two different diets and sampled at 6 hours post-feeding. Our results would indicate that differences in bacterial diversity between solid and liquid phases of the rumen within the same animal may be affected by sampling time.

Figures 4.4.1 and 4.4.2 show the dendrograms of the ARISA and the DGGE profiles of solid and liquid ruminal digesta from sheep fed the two experimental diets. Dendrograms correspond to samples taken from an individual sheep, as in the DGGE analysis all the samples from the same sheep were loaded in one gel to avoid possible problems related to the lack of reproducibility between different gels. A different clustering pattern was observed with ARISA and DGGE. In general, DGGE showed clearer discrimination among rumen samples from the solid digesta and from ruminal fluid compared with ARISA. This was specially marked in sheep 1 and 3, for which solid and liquid samples formed two different clusters, and in sheep 4 five out of six samples of each phase also clustered together with DGGE. In contrast, this trend was not observed in ARISA-based dendrograms, and solid and liquid samples phases did not show any obvious clustering in any of the sheep. ARISA clustering pattern was more complex, which was probably related to the higher sensitivity of this technique compared with that of DGGE. No time-related clustering was observed in the dendrograms with none of both techniques, which is apparently in contrast with the postprandrial changes in bacterial diversity detected by ARISA. It must be present that dendrograms were constructed individually for each sheep, and that a cluster analysis including all samples within each technique would probably offer different information. However, this type of analysis was not made to avoid the problems of comparing different DGGE gels (Moeseneder *et al.*, 1999).

SHEEP 1



SHEEP 2

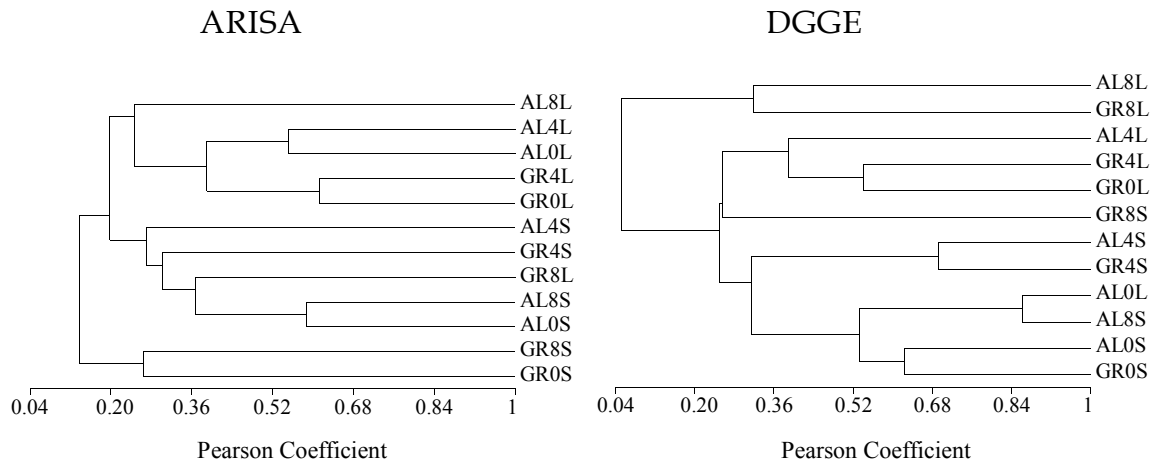
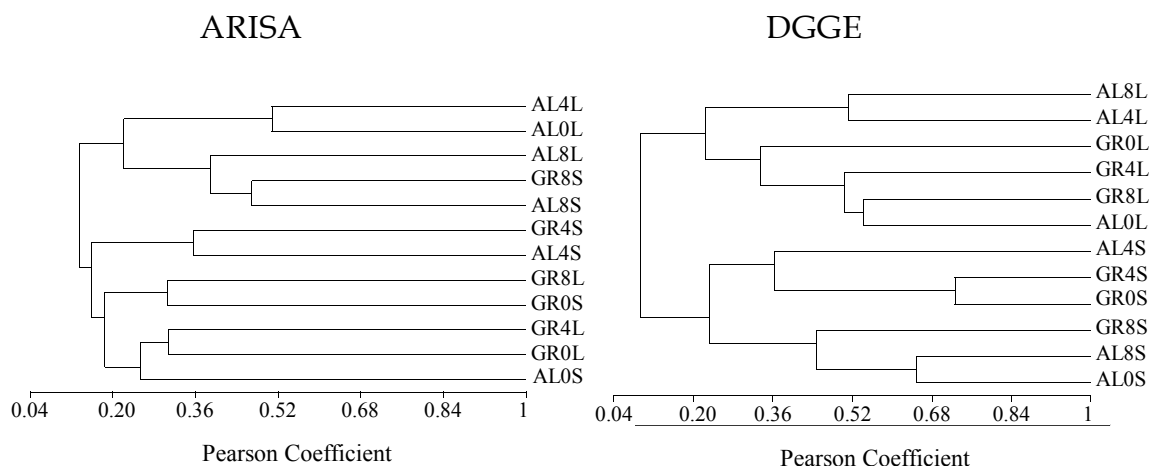


Figure 4.4.1: Dendrograms of ARISA and DGGE profiles of solid (S) and liquid (L) ruminal digesta from sheep fed diets containing 30% concentrate and 70% of either alfalfa hay (AL) or grass hay (GR). Samples were taken at 0, 4 and 8 h post-feeding. Dendrograms correspond to samples taken from an individual sheep (sheep 1 and 2)

SHEEP 3



SHEEP 4

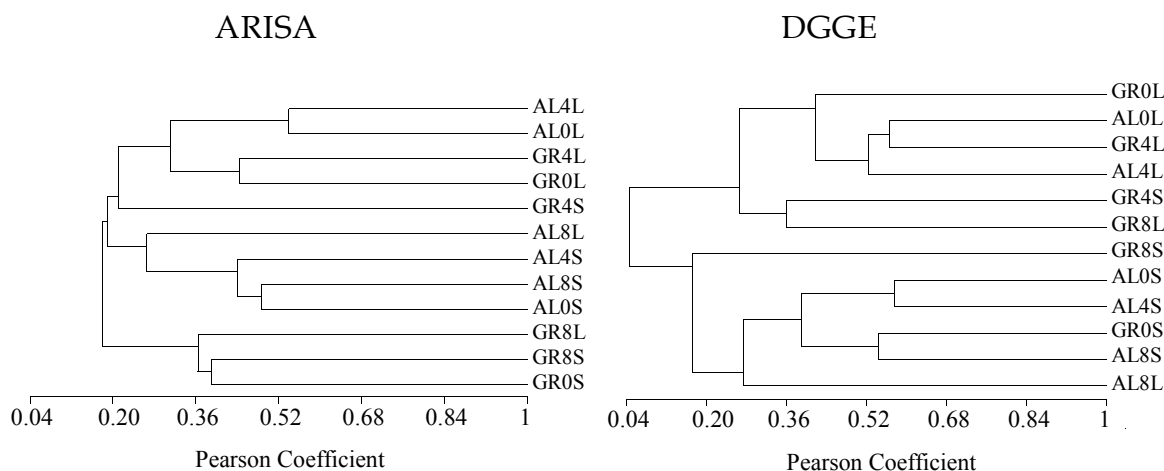


Figure 4.4.2: Dendrograms of ARISA and DGGE profiles of solid (S) and liquid (L) ruminal digesta from sheep fed diets containing 30% concentrate and 70% of either alfalfa hay (AL) or grass hay (GR). Samples were taken at 0, 4 and 8 h post-feeding. Dendrograms correspond to samples taken from an individual sheep (sheep 3 and 4)

In conclusion, collectively, these results based on ARISA and DGGE fingerprinting indicate that rumen bacterial diversity in solid and fluid fractions of the rumen were influenced by the forage fed to sheep. However, assessment of postprandial changes in bacterial communities varied with the technique used for fingerprinting. Postprandial changes in bacterial diversity were detected by ARISA but not by DGGE, resulting in a different interpretation of the information obtained from the same samples. In spite of the lower total band number, DGGE showed, in general, a clearer discrimination between the solid and liquid phases of the rumen as compared with ARISA. Furthermore, DGGE analysis permits extraction of DNA of a target band from a gel and sequence analysis through production of clone libraries, which confers a remarkable advantage of this method over ARISA in microbial community analysis (Okubo and Sugiyama, 2009). However, on the whole, the ARISA method was shown to be easier and less time consuming than DGGE technique, and therefore more appropriate for the rapid assessment of the rumen bacterial diversity when a great number of samples need to be analyzed. ARISA seems to be useful as a means of rapidly obtain profiles of bacterial communities in ruminal samples and to detect subtle changes in diversity. The postprandial changes in bacterial diversity detected by ARISA highlight the importance of taking samples over time to account for diurnal variations.

Acknowledgements: Funding was provided by the Spanish CICYT (Projects AGL2008-04707-C02-02 and AGL-2011-22628). C. Saro gratefully acknowledges the receipt of a scholarship from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain.

4.4.4 References

- Cherif, H., H. Ouzari, M. Marzorati, L. Brusetti, N. Jedidi, A. Hassen D. Daffonchio. 2008. Bacterial community diversity assessment in municipal solid waste compost amended soil using DGGE and ARISA fingerprinting methods. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1159–1167.
- Crosby, L. D., C. S. Criddle. 2003. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. *BioTechniques.* 34: 2–9
- Danovaro, R., G. M. Luna, A. Dell'Anno, B. Pietrangeli. 2006. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5982-5989.

- Denman, S. E., M. J. Nicholson, J. L. Brookman, M. K. Theodorou, C. S. McSweeney. 2008. Detection and monitoring of anaerobic rumen fungi using an ARISA method. *Lett. Appl. Microbiol.* 47: 492-499.
- Fisher, M. M., E. W. Triplett. 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4630-4636.
- Hori, T., S. Haruta, Y. Ueno, M. Ishii, Y. Igarashi. 2006. Direct comparison of single-strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16S rRNA gene fragments. *J. Microbiol. Methods.* 66: 165-169.
- Huws, S. A., M. R. F. Lee, S. M. Muetzel, M. B. Scott, R. J. Wallace, N. D. Scollan. 2010. Forage type and fish oil cause shifts in rumen bacterial diversity. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73: 396-407.
- Julien, C., J. P. Marden, C. Bonnefont, R. Moncoulon, E. Auclair, V. Monteils, C. Bayourthe. 2010. Effects of varying proportions of concentrates on ruminal-reducing power and bacterial community structure in dry dairy cows fed hay-based diets. *Animal.* 4: 1641-1646.
- Kocherginskaya, S. A., R. I. Aminov, B. A. White. 2001. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe.* 7: 119-134.
- Koike, S., J. Pan, Y. Kobayashi, K. Tanaka. 2003. Kinetics of *in sacco* fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *J. Dairy Sci.* 86: 1429-1435.
- Kong, Y., R. Teather, R. Forster. 2010. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74: 612-622.
- Kongmun, P., M. Wanapat, P. Pakdee, C. Navanukraw, Z. Yu. 2011. Manipulation of rumen fermentation and ecology of swamp buffalo by coconut oil and garlic powder supplementation. *Livest. Sci.* 135: 84-92.
- Larue, R., Z. Yu, A. A. Parisi, A. R. Egan, M. Morrison. 2005. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and *rrs* gene sequencing. *Environ. Microbiol.* 7: 530-543.
- Loisel, P., J. Harmand, O. Zemb, E. Latrille, C. Lobry, J. P. Delgenès, J. J. Godon. 2006. Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environ. Microbiol.* 8: 720-731.
- Li, M., G. B. Penner, E. Hernandez-Sanabria, M. Oba, L. L. Guan. 2009. Effects of sampling location and time, and host animal on assessment of bacterial diversity and fermentation parameters in the bovine rumen. *J. Appl. Microbiol.* 107: 1924-1934.

- Lindström, E. S., E. Leskinen. 2002. Do neighbouring lakes share common taxa of bacterioplankton? Comparison of 16S rDNA fingerprints and sequences from three geographic regions. *Microb. Ecol.* 44: 1-9.
- Martin, C., G. Fonty, B. Michalet-Doreau. 2002. Factors affecting the fibrolytic activity of the digestive microbial ecosystems in ruminants, in: *Gastrointestinal microbiology in animals*. Martin, S. A., ed. Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India.
- Martinez, M. E., M. J. Ranilla, M. L. Tejido, C. Saro, M. D. Carro. 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.
- McEwan, N. R., L. Abecia, M. Regensbogenova, C. L. Adam, P. A. Findlay, C. J. Newbold. 2005. Rumen microbial population dynamics in response to photoperiod. *Lett. Appl. Microbiol.* 41: 97-101.
- Moeseneder, M. M., J. M. Arrieta, G. Muyzer, C. Winter, G. J. Herndl. 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.
- Morgavi, D. P., J. P. Jouany, C. Martin, M. J. Ranilla. 2006. Archaeal community structure diversity in the rumen of faunated and defaunated sheep. *Int. Congr. Ser.* 1293: 127-130.
- Muyzer, G., E. C. de Waal, A. G. Uitterlinden. 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.
- NRC (National Research Council). Committee on the Nutrient Requirements of Small Ruminants. 2007. *Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids*. The National Academies Press, Washington DC, USA.
- Okubo, A., S. Sugiyama. 2009. Comparison of molecular fingerprinting methods for analysis of soil microbial community structure. *Ecol Res* 24: 1399-1405.
- Palmonari, A. D., M. Stevenson, D. R. Mertens, C. W. Cruywagen, P. J. Weimer. 2010. pH dynamics and bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93: 279-287.
- Petri, R. M., R. J. Forster, W. Yang, J. J. McKinnon, T. A. McAllister. 2012. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. *J. Appl. Microbiol.* (In press).
- Pitta, D. W., W. E. Pinchak, S. E. Dowd, J. Osterstock, V. Gontcharova, E. Youn, K. Dorton, I. Yoon, B. R. Min, J. D. Fulford, T. A. Wickersham, D. P. Malinowski. 2010. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microb. Ecol.* 59: 511-522.

- Ramos, S., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, M. E. Martínez, C. Saro, M. D. Carro. 2009a. Influence of detachment procedure and diet on recovery of solid-associated bacteria from sheep ruminal digesta and representativeness of bacterial isolates as assessed by automated ribosomal intergenic spacer analysis-polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* 92: 5659-5668.
- Ramos, S., M. L. Tejido, M. E. Martínez, M. J. Ranilla, M. D. Carro. 2009b. Microbial protein synthesis, ruminal digestion, microbial populations, and nitrogen balance in sheep fed diets varying in forage-to-concentrate ratio and type of forage. *J. Anim. Sci.* 87: 2924-2934.
- Reche, I., E. Pulido-Villena, R. Morales-Baquero, E. O. Casamayor. 2005. Does ecosystem size determine aquatic bacterial richness? *Ecology.* 86: 1715-1722.
- Sadet, S., C. Martin, B. Meunier, D. P. Morgavi. 2007. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal.* 1: 939-944.
- Sadet-Bourgeteau, S., C. Martin, D. P. Morgavi. 2010. Bacterial diversity dynamics in rumen epithelium of wethers fed forage and mixed concentrate forage diets. *Vet. Microbiol.* 146: 98-104.
- Shannon, C. E., W. Weaver. 1949. *The mathematical theory of communication.* University of Illinois Press, Urbana, Illinois, USA.
- Sundset, M., J. Edwards, Y. Cheng, R. Senosiain, M. Fraile, K. Northwood. 2009. Molecular diversity of the rumen microbiome of Norwegian reindeer on natural summer pasture. *Microb. Ecol.* 57: 335-348.
- Talbot, G., E. Topp, M. F. Palin, D. I. Massé. 2008. Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water Res.* 42: 513-537.
- Thompson, J. R., L. A. Marcelino, M. F. Polz. 2002. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: Formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucl. Acids Res.* 30: 2083-2088.
- Weimer, P. J., G. C. Waghorn, C. L. Odt, D. R. Mertens. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 122-134.
- Weimer, P. J., D. M. Stevenson, D. R. Mertens. 2010. Shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat-depressing conditions. *J. Dairy Sci.* 93: 265-278.
- Welkie, D. G., D. M. Stevenson, P. J. Weimer. 2010. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe.* 16: 94-100
- Yu, Z., M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques.* 36: 808-812.

4.5 PRUEBA 5

DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN BACTERIANA Y LA ACTIVIDAD FIBROLÍTICA EN LAS FASES LÍQUIDA Y SÓLIDA DE LA DIGESTA DEL RUMEN DE OVEJAS ALIMENTADAS CON DOS DIETAS FORRAJERAS

**DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN BACTERIANA Y
LA ACTIVIDAD FIBROLÍTICA EN LAS FASES
LÍQUIDA Y SÓLIDA DE LA DIGESTA DEL RUMEN
DE OVEJAS ALIMENTADAS CON DOS
DIETAS FORRAJERAS**

C. Saro, M. J. Ranilla y M. D. Carro

Departamento de Producción Animal, Universidad de León, 24071 León,
España

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

ITEA, vol. extra 38: 324-326

ITEA, vol. extra 38: 836-838

Distribution of bacterial population and fibrolytic activity in liquid and solid digesta in the rumen of sheep fed two forage diets

Four ruminally cannulated merino sheep were used to evaluate the effects of two diets (AL: 70:30 alfalfa hay:concentrate; GR: 70:30 grass hay:concentrate) and three times of sampling (0, 4 and 8 h post-feeding) on fibrolytic activity in the rumen and the distribution of bacteria between the liquid and solid phase in ruminal digesta. Carboxymethylcellulase, xylanase, and amylase activities were measured in solid and liquid rumen contents. Real time PCR (qPCR) was used to measure bacterial DNA (DNAb) concentration in both phases. Carboxymethylcellulase and xylanase activities were greater ($P<0.01$) at 0 compared with 4 and 8 h postfeeding, but sampling time did not affect ($P>0.05$) amylase activity. All activities were greater ($P<0.001$) in the solid than in the liquid phase of the ruminal digesta. Xylanase activity was greater for GR than for AL diet, but carboxymethylcellulase and amylase activities were not affected by the diet. Forage type did not affect DNAb concentration in the solid ($P=0.664$), the liquid ($P=0.895$) or total ($P=0.843$) ruminal digesta. Amount of DNAb at 4 h post-feeding was lower than just before feeding in both the solid and liquid digesta ($P<0.05$ and 0.001 respectively), but recovered initial values at 8 h post feeding which may have been due to the lag time that takes bacteria to attach fiber particles or the drastic decrease in bacterial number that occurs in the rumen right after feeding because of the changes in rumen conditions of osmotic pressure, temperature or pH. Proportion of bacteria in the solid digesta ranged from 82.6% to 91.3% of total ruminal bacteria, and was higher ($P<0.05$) at 4 h compared with that at 0 and 8 h post-feeding. These results confirm that solid-associated bacteria represent the major proportion of ruminal bacteria in ruminants fed forage diets, and indicate that forage quality has no influence on their relative proportion.

Key words: solid-associated bacteria, rumen, fibrolytic activity, forage type, sheep

4.5.1 Introducción

La fase sólida del rumen es conocida por ser la de mayor capacidad para degradar la pared celular de los alimentos (Briesacher *et al.*, 1992; Michalet-Doreau y Doreau, 2001). De esta degradación se encargan, sobre todo, las bacterias asociadas a la fase sólida. La proporción de estas bacterias, en comparación con las bacterias libres en el líquido depende de diversos factores, entre los que destaca la dieta que reciben los animales. Diversos estudios han demostrado que cuando los rumiantes reciben dietas con elevado contenido en forraje hay mayor cantidad de microorganismos asociados a la fase sólida de la digesta (Yang *et al.*, 2001; Ranilla y Carro, 2003) y que la proporción varía en función del tiempo que haya transcurrido desde la administración del alimento (Craig *et al.*, 1987). Por consiguiente la actividad fibrolítica en el rumen también es más elevada cuando los rumiantes reciben elevadas cantidades de forraje en la dieta que cuando son alimentados con proporciones elevadas de concentrados (Martin *et al.*, 1999). Sin embargo no existe información en el ganado ovino sobre cómo puede afectar el tipo de forraje en la dieta a la proporción de microorganismos asociados a la fibra y, por tanto, a la actividad enzimática. Por todo ello el objetivo del presente trabajo fue investigar los efectos del tipo de forraje en la dieta y el tiempo de muestreo sobre la distribución de las poblaciones bacterianas, utilizando para ello qPCR, y la actividad fibrolítica en las fases sólida y líquida del rumen.

4.5.2 Material y métodos

Se utilizaron 4 ovejas de raza merina ($58,3 \pm 3,27$ kg) canuladas en el rumen en un diseño cruzado. Se formularon dos dietas experimentales con una relación forraje:concentrado de 70:30 siendo el forraje heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR). El contenido en proteína bruta y fibra neutro-detergente de la dieta AL fue de 186 y 426 g/kg de materia seca (MS), respectivamente, y el de la dieta GR de 121 y 499 g/kg MS. Las dietas fueron administradas a los animales a nivel restringido (52 g de MS/kg de peso vivo^{0,75}) para minimizar la selección de alimento, en dos tomas iguales diarias (8:00 y 20:00 h). Tras 15 días de adaptación a la dieta se tomaron muestras del contenido ruminal inmediatamente antes (0 h) y 4 y 8 h tras la administración de la primera toma de alimento en dos días no consecutivos. Una muestra de 50 g se secó en estufa a 60°C para determinar el contenido en MS. El resto se filtró a través de dos capas de gasa para separar las fracciones líquida y sólida, y en la fracción líquida se midió inmediatamente el pH. Para

determinar la actividad enzimática se tomaron 10 g de sólido y 5 mL de líquido que se congelaron inmediatamente a -80°C hasta el análisis. Para el análisis de la distribución de las bacterias entre las fases sólida y líquida se tomó la misma cantidad de muestra de las fases sólida y líquida en recipientes estériles y se congeló a -80°C hasta la extracción de ADN. En ambos casos las muestras tomadas los dos días se mezclaron por hora de muestreo antes de los análisis correspondientes. Adicionalmente, se tomó otra muestra del contenido ruminal a las 12 h, en la que únicamente se midió el pH en la fase líquida.

Para la determinación de la actividad enzimática las muestras se descongelaron a 4°C . La muestra sólida fue picada con tijeras y se pesaron 3 g en una bolsa Stomacher®. A continuación se añadieron 15 mL de buffer fosfato (pH=6,5) que contenía ditioneitol (DTT; 1mM) para prevenir la degradación de las enzimas. La mezcla fue homogeneizada en un Stomacher (Stomacher 400 Circulator, Seward LTD., Londres, Reino Unido) a 230 revoluciones por minuto durante 5 minutos para desligar los microorganismos asociados a las partículas de alimento. De la suspensión resultante se tomaron 1,5 mL que se trataron durante 3 minutos en un Mini-Beadbeater (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, Estados Unidos) para lisar los microorganismos y liberar las enzimas intracelulares. Tras el tratamiento se centrifugaron las muestras (10', 10 000 x g, 4°C) y en el sobrenadante se analizaron las actividades carboximetilcelulasa, xilanas y amilasa según el método propuesto por Giraldo *et al.* (2008), usando como sustrato carboximetilcelulosa, xilano de avena y almidón soluble, respectivamente. Por su parte, las muestras de líquido ruminal tras descongelarse se trataron en un Mini-Beadbeater y se analizaron siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. La actividad enzimática se expresó como μmoles de glucosa o xilosa liberados del sustrato correspondiente por 1 g de MS de la digesta sólida o 1 mL de la digesta líquida en un minuto a 39°C y pH=6,5.

Para determinar la proporción de bacterias en cada fase de la digesta en primer lugar se procedió a extraer el ADN de las muestras. Para ello las muestras líquidas se descongelaron a 4°C , se centrifugó 1 mL (15', 13 000 x g, 4°C), se descartó el sobrenadante y se utilizó el pellet obtenido para la extracción de ADN. Las muestras de la fase sólida se liofilizaron antes de la extracción de ADN. Los pellets obtenidos de las muestras líquidas y 120 mg de MS de las muestras de la fase sólida se mezclaron con un buffer de lisis y se trataron durante 3 minutos en un Mini-Beadbeater para lisar los

microorganismos ruminales. Posteriormente, la extracción de ADN se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Yu y Morrison (2004) y utilizando el kit QIAamp DNA Stool (QIAGEN, Valencia, CA, Estados Unidos), pero incluyó un paso adicional en el que las muestras se trataron con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para eliminar inhibidores de la PCR. Se utilizaron primers previamente validados para el ADN codificante del gen del ribosoma 16S bacteriano (Denman y McSweeney, 2006). Como estándares se utilizaron pellets de bacterias asociadas a la fase sólida y líquida que se aislaron del rumen de las ovejas siguiendo los procedimientos descritos por Ramos *et al.* (2009). El aislamiento de bacterias asociadas a la fase sólida y líquida se realizó a los tres tiempos de muestreo (0, 4 y 8 h) y los pellets obtenidos de cada oveja se mezclaron para obtener un pellet representativo de las bacterias asociadas a fase sólida y otro de las asociadas a la fase líquida.

El ADN extraído se diluyó 1:10 antes de realizar los análisis de qPCR en un ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Las condiciones de PCR fueron: 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto, seguidos de una curva de desnaturalización. Cada mezcla de PCR contenía 10 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), 0,9 µL de cada primer, 2 µL de la muestra de ADN y agua destilada hasta un volumen final de 20 µL. Los valores obtenidos se analizaron con el software StepOne versión 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). La concentración de ADN en la digesta ruminal total se calculó como la suma de la concentración de ADN bacteriano (ADNb) en la digesta sólida y en el contenido líquido, teniendo en cuenta las proporciones de MS y líquido en el total de la digesta. Los resultados obtenidos para cada fase ruminal (digesta total, fase sólida y fase líquida) se analizaron independientemente.

Los datos se sometieron a un análisis de varianza para medidas repetidas en el tiempo utilizando el PROC MIXED del SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, Estados Unidos). Los efectos del tipo de forraje, tiempo y periodo se consideraron fijos y el efecto animal se consideró aleatorio. El nivel de significación estadística se estableció en $P < 0,05$.

4.5.3 Resultados y discusión

4.5.3.1 Contenido en materia seca de la digesta ruminal

Como puede observarse en la Tabla 4.5.1, el porcentaje de MS de la digesta ruminal no se vio afectado por el tipo de forraje en la dieta ($P=0,634$), pero fue más alto ($P<0,05$) a las 4 h post-alimentación que a las 0 y 8 h, posiblemente debido al alimento ingerido.

Tabla 4.5.1: Efecto del tipo de forraje (FOR) y tiempo de muestreo tras la administración de alimento (T) en el contenido en materia seca (MS) de la digesta ruminal de ovejas alimentadas con dietas con relación forraje:concentrado 70:30 y heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) como forraje

| Parámetro y dieta | T (h) | | | EEM | Valor de P | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|------|------------|-------|---------|
| | 0 | 4 | 8 | | FOR | T | FOR x T |
| MS (g/100g) | | | | | | | |
| AL | 22,8 ^a | 24,5 ^b | 23,2 ^{ab} | 0,54 | 0,634 | 0,013 | 0,963 |
| GR | 23,0 ^a | 24,9 ^b | 23,3 ^{ab} | | | | |

^{a,b} En la misma fila, valores con diferente superíndice difieren ($P<0,05$).

4.5.3.2 Actividades enzimáticas en el contenido ruminal

Como puede observarse en la Tabla 4.5.2 las actividades carboximetilcelulasa y xilanasas fueron más elevadas a las 0 h que a las 4 y 8 h post-alimentación ($P<0,05$), lo cual podría ser achacado al descenso del pH sufrido en el rumen en las primeras horas tras la alimentación, por debajo de 6,5, para volver a estabilizarse transcurridas 12 h desde la alimentación (Figura 4.5.1). Martin *et al.* (1993) obtuvieron resultados en los que las enzimas tenían un pico de actividad a las 5 h en la fase líquida, aunque en este caso se trataba de actividad enzimática analizada en pellets de bacterias. En cambio, en la fase sólida, los resultados de actividad más elevados se encontraron al final del periodo posprandial, que correspondería con las 0 h del presente estudio (12 h tras la alimentación). Resultados similares fueron encontrados en otro estudio de los mismos autores que analizó los cambios de actividad enzimática en función de la fracción del rumen muestreada (Martin *et al.*, 1999)

Tabla 4.5.2: Efecto del tipo de forraje (FOR) y tiempo de muestreo (T) en las actividades enzimáticas (AE) del contenido ruminal de ovejas alimentadas con dietas con relación forraje:concentrado 70:30 y heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) como forraje

| Parámetro | Dieta | T (h) | | | EEM ² | Valor de P | | |
|-----------------------------|-------|-------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------|--------|---------|
| | | 0 | 4 | 8 | | FOR | T | FOR x T |
| Carboximetilcelulosa | | | | | | | | |
| AE total | AL | 1,47 ^a | 1,06 ^b | 1,01 ^b | 0,086 | 0,563 | <0,001 | 0,991 |
| | GR | 1,41 ^a | 1,02 ^b | 0,98 ^b | | | | |
| AE sólido | AL | 3,68 ^a | 2,31 ^b | 2,05 ^b | 0,29 | 0,618 | <0,001 | 0,698 |
| | GR | 3,73 ^a | 2,71 ^b | 1,97 ^b | | | | |
| AE líquido | AL | 0,81 ^a | 0,65 ^b | 0,70 ^{ab} | 0,042 | 0,012 | <0,001 | 0,180 |
| | GR | 0,73 ^a | 0,46 ^b | 0,67 ^a | | | | |
| % AE en sólido | AL | 56,6 ^a | 52,0 ^{ab} | 45,5 ^b | 2,57 | 0,007 | <0,001 | 0,041 |
| | GR | 59,9 ^a | 67,0 ^a | 47,0 ^b | | | | |
| Xilanasa | | | | | | | | |
| AE total | AL | 31,1 ^b | 18,6 ^a | 18,3 ^a | 2,080 | 0,011 | <0,001 | 0,646 |
| | GR | 33,9 ^b | 25,4 ^a | 23,7 ^a | | | | |
| AE sólido | AL | 112 ^b | 62,6 ^a | 60,7 ^a | 8,43 | 0,012 | <0,001 | 0,593 |
| | GR | 122 ^b | 88,5 ^a | 84,9 ^a | | | | |
| AE líquido | AL | 7,38 ^b | 4,39 ^a | 5,46 ^a | 0,568 | 0,634 | <0,001 | 0,994 |
| | GR | 7,10 ^b | 4,14 ^a | 5,30 ^a | | | | |
| % AE en sólido | AL | 81,4 ^b | 82,1 ^a | 76,0 ^a | 2,07 | 0,045 | 0,036 | 0,776 |
| | GR | 83,4 | 86,4 | 80,8 | | | | |
| Amilasa | | | | | | | | |
| AE total | AL | 6,93 | 5,29 | 6,14 | 0,829 | 0,468 | 0,347 | 0,868 |
| | GR | 6,92 | 6,10 | 6,85 | | | | |
| AE sólido | AL | 23,1 | 13,3 | 17,9 | 2,86 | 0,122 | 0,097 | 0,510 |
| | GR | 23,0 | 19,5 | 23,3 | | | | |
| AE líquido | AL | 2,18 | 2,72 | 2,57 | 0,367 | 0,060 | 0,883 | 0,545 |
| | GR | 1,94 | 1,65 | 1,91 | | | | |
| % AE en sólido | AL | 77,3 | 64,4 | 67,9 | 3,00 | 0,009 | 0,161 | 0,057 |
| | GR | 76,9 | 80,0 | 75,1 | | | | |

¹ Las actividades carboximetilcelulosa, xilanasa y amilasa en el sólido, líquido o en el total se expresan como μmol de glucosa o xilosa liberados de carboximetilcelulosa, xilano o almidón soluble por 1 gramo de MS de digesta total, 1 g de digesta sólida o 1 mL de digesta líquida en 1 minuto a 39°C y pH 6,5.

² EEM: error estándar de la media.

a, b en la misma fila, valores con diferente superíndice difieren ($P < 0,05$).

Por el contrario, la actividad amilasa no varió con el tiempo de muestreo ni en la fase sólida ni en la líquida ($P = 0,097$ y $0,883$, respectivamente), confirmando los resultados obtenidos por Martin *et al.* (1993). Esta falta de variación en la actividad amilasa con el tiempo podría ser debida a que los microorganismos con capacidad amilolítica resisten mejor los pH inferiores a 6,5 que los microorganismos celulolíticos.

Se observó una correlación positiva entre la actividad enzimática en la fase sólida y en la fase líquida para las actividades carboximetilcelulasa ($P=0,015$; $r=0,487$; $n=24$) y xilanasa ($P=0,017$; $r=0,481$; $n=24$). Por el contrario, en el caso de la actividad amilasa no existió correlación ($P=0,566$) entre las actividades en las dos fases ruminales.

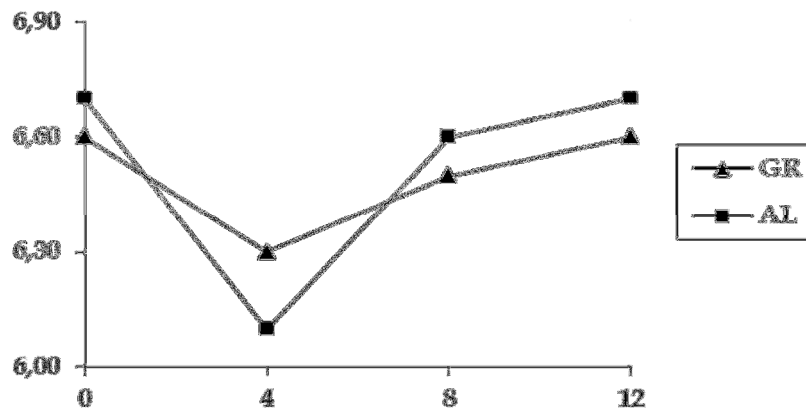


Figura 4.5.1: Evolución posprandial del pH del líquido ruminal de ovejas alimentadas con dietas con relación forraje:concentrado 70:30 y heno de gramíneas (GR) o heno de alfalfa (AL) como forraje

Todas las actividades determinadas fueron mayores ($P<0,001$) en la fase sólida que en la fase líquida, pero las diferencias más marcadas se encuentran en la actividad xilanasa, donde el porcentaje de actividad enzimática en la fase sólida varía entre el 76 y el 86% de la actividad total, seguida de la amilasa (64 - 80%) y la carboximetilcelulosa (46 - 67%). En línea con estos resultados, Martin *et al.* (1993) encontraron que la mayor parte de la actividad enzimática fibrolítica y amilolítica se encuentra relacionada con los microorganismos asociados a la fase sólida.

Con respecto a las diferencias en la actividad enzimática debidas a la dieta, donde más marcadas diferencias se encuentran es en la actividad xilanasa, ya que la actividad total y la actividad en el sólido fueron más altas para la dieta GR que para la dieta AL ($P<0,05$), pero no se observaron diferencias ($P=0,568$) en la fase líquida. La mayor actividad xilanasa observada en el rumen de las ovejas que recibían la dieta GR podría ser debida al mayor contenido en fibra de la dieta GR comparada con la dieta AL (499 vs. 426 g fibra neutro detergente/kg MS). Martin *et al.* (1999) observaron actividades fibrolíticas más elevadas al administrar a ovejas dietas con

elevado contenido en concentrado, mientras que la actividad amilolítica era mayor con dietas con un elevado contenido en concentrado. En nuestro estudio la proporción de concentrado fue la misma en las dos dietas y, por tanto, es lógica la ausencia de diferencias en la actividad amilasa entre las dietas.

Por lo que respecta a las diferencias entre animales, una de las ovejas presentó los valores de las tres actividades enzimáticas en la fase líquida más altos ($P < 0,05$) que el resto, mientras que otra oveja presentó estas actividades en mayor ($P < 0,05$) cantidad en el contenido total y en el contenido sólido.

4.5.3.3 Concentración bacteriana en el contenido ruminal

Las cantidades de ADN extraído de las muestras de la fase sólida fueron 68, 261 y 83 $\mu\text{g/g MS}$ a las 0, 4 y 8 h para la dieta AL, y 105, 301 y 171 $\mu\text{g/g MS}$ para la dieta GR (valores no mostrados). Estos valores están en el rango de los obtenidos en otros estudios (Sharma *et al.*, 2003; Yu y Morrison, 2004). Para las dos dietas, las cantidades de ADN extraído fueron mayores ($P < 0,001$) a las 4 que a las 0 h post-ingestión, sin que existiesen diferencias ($P > 0,05$) entre las concentraciones a las 0 y 8 h post-ingestión. Las relaciones A_{260}/A_{280} en las muestras de la fase sólida oscilaron entre 1,70 y 1,98, y no se vieron afectadas por el tiempo de muestreo ($P = 0,861$) ni por el tipo de forraje ($P = 0,550$).

Las cantidades de ADN extraído del líquido ruminal fueron 2,57, 2,11 y 3,34 $\mu\text{g/mL}$ a las 0, 4 y 8 h post-alimentación para la dieta AL, y 2,15, 2,06 y 3,12 $\mu\text{g/mL}$ para la dieta GR (valores no mostrados), y no se observaron diferencias entre dietas ($P = 0,373$). Estos valores son similares a los indicados por Broudiscou *et al.* (1998), quienes obtuvieron entre 2,6 y 4,0 μg de ADN/mL de líquido ruminal de ovejas utilizando diferentes métodos de extracción. No hubo diferencias ($P = 0,352$) en la cantidad de ADN extraído entre las 0 y 4 h post-ingestión, pero la cantidad de ADN fue mayor a las 8 h post-ingestión que a las 0 y 4 h ($P < 0,05$). Las relaciones A_{260}/A_{280} en las muestras del líquido ruminal oscilaron entre 1,62 y 2,00, y no se vieron afectadas por la dieta ($P = 0,475$) ni por el tiempo de muestreo ($P = 0,114$).

En los análisis de qPCR, los valores medios para la curva estándar de las bacterias asociadas a la fase sólida fueron -3,382 para la pendiente y 0,998 para el coeficiente de regresión, y para las bacterias asociadas a la fase líquida -3,325 y 0,993. Las eficiencias medias de la PCR fueron 97,6% y 98,3% para las muestras de las fases sólida y líquida, respectivamente.

Tabla 4.5.3: Efecto del tipo de forraje (FOR) y tiempo de muestreo tras la administración de alimento (T) en la cantidad de ADN bacteriano (ADNb) del contenido ruminal de ovejas alimentadas con dietas con relación forraje:concentrado 70:30 y heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) como forraje

| Parámetro y dieta | T (h) | | | EEM | Valor de P | | |
|-------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------|------------|--------|---------|
| | 0 | 4 | 8 | | FOR | T | FOR x T |
| ADNb | | | | | | | |
| (µg / g materia fresca) | | | | | | | |
| AL | 75,3 ^a | 48,0 ^b | 68,5 ^{ab} | 7,13 | 0,843 | 0,008 | 0,968 |
| GR | 72,3 ^a | 48,7 ^b | 67,3 ^{ab} | | | | |
| ADNb en el sólido | | | | | | | |
| (µg / g materia seca) | | | | | | | |
| AL | 290 ^a | 179 ^b | 245 ^{ab} | 26,7 | 0,664 | 0,008 | 0,868 |
| GR | 265 ^a | 180 ^b | 241 ^a | | | | |
| ADNb en el líquido | | | | | | | |
| (µg / mL) | | | | | | | |
| AL | 12,3 ^a | 5,78 ^b | 14,8 ^a | 1,621 | 0,895 | <0,001 | 0,750 |
| GR | 13,4 ^a | 4,32 ^b | 14,7 ^a | | | | |
| % ADNb en el sólido | | | | | | | |
| AL | 87,7 ^{ab} | 91,3 ^a | 83,9 ^b | 2,15 | 0,378 | 0,006 | 0,690 |
| GR | 84,3 ^a | 91,6 ^b | 82,3 ^a | | | | |

^{a,b} En la misma fila, valores con diferente superíndice difieren ($P < 0,05$).

El contenido de ADNb de la fase sólida varió entre 180 y 290 µg/g MS, y no existieron diferencias ($P=0,664$) entre dietas. La concentración de ADNb en el sólido a las 4 h tras la alimentación fue menor ($P < 0,05$) que a las 0 y 8 h. En cuanto al contenido en ADNb en la fase líquida, los resultados observados son similares a los de la fase sólida, no existiendo variación entre dietas pero sí una marcada diferencia entre los valores a las 4 y las 0 y 8 h ($P=0,013$ y $0,002$ respectivamente). Como consecuencia de esto, la cantidad de ADN en la digesta total fue menor ($P < 0,05$) a las 4 que a las 0 y 8 h. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Bryant y Robinson (1961) y Leedle *et al.* (1982), quienes realizaron estudios similares en vacuno para analizar las variaciones en la flora ruminal a lo largo del día y bajo diferentes condiciones dietéticas. Estos autores observaron que los animales alimentados con una dieta con elevado contenido en forraje presentaban mayores cantidades de microorganismos en el contenido ruminal al final del periodo posprandial y una disminución importante en el número de los mismos justo después de la alimentación. Este descenso, según estos autores, no puede ser achacado únicamente al paso de microorganismos a tractos posteriores del sistema gastrointestinal, ni a un efecto dilución por la llegada al rumen de alimento y agua, si no que es más posiblemente debido al cambio de condiciones que se producen en el rumen tras la ingestión de

alimento. Este hecho se debe a que hay determinados microorganismos cuyo metabolismo no se adapta rápidamente a las nuevas condiciones, y por tanto su número disminuye drásticamente tras la ingestión de alimento. El cambio de las condiciones comprende, en primer lugar, un cambio en la presión osmótica así como un descenso de la temperatura del rumen. Asimismo, el pH desciende (Figura 4.5.1), aunque valores superiores a 6 no parecen afectar a la mayoría de los microorganismos ruminales (Stewart, 1977). Sin embargo, las bacterias fibrolíticas, que serán la mayoría de las asociadas a la fase sólida, tienen pH óptimos de actuación más elevados. Otro factor que puede afectar a los microorganismos justo después de la ingestión es la entrada de oxígeno al rumen con el alimento y el agua de bebida, ya que el oxígeno restringe la actividad fermentativa de grupos como las bacterias celulolíticas (Hungate, 1966).

Para las dos dietas y los tres tiempos de muestreo, la cantidad de ADN_b fue mayor ($P < 0,001$) en la fase sólida que en la líquida, y las bacterias de la fase sólida representaron entre el 82,3% y el 91,6% del total de bacterias en la digesta ruminal. Estos valores guardan relación con lo observado en el caso de la actividad enzimática, que también fue mayor en la fase sólida de la digesta y están en el rango de los observados por otros autores (Craig *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 2001) utilizando diferentes metodologías de medida en el ganado vacuno. Estos resultados confirman que las bacterias asociadas a la fase sólida representan un porcentaje mayoritario de las bacterias ruminales en animales alimentados con dietas forrajeras, e indican la validez de la técnica qPCR para este tipo de estudios.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el CICYT (Proyectos AGL-2004-04755-CO2-01 y AGL-2008-04707-CO2-02) y la Junta de Castilla y León (Proyecto GR158). C. Saro disfruta de una beca FPU del MEC (AP 2006-03049).

4.5.4 Referencias bibliográficas

- Briesacher, S. L., T. May, K. N. Grigsby, M. S. Kerley, R. V. Anthony, J. A. Paterson. 1992. Use of DNA probes to monitor nutritional effects on ruminal prokaryotes and *Fibrobacter succinogenes* S85. *J. Anim. Sci.* 70: 289-295.
- Broudiscou, L., H. Geissler, A. Broudiscou. 1998. Estimation of the growth rate of mixed ruminal bacteria from short-term DNA radiolabeling. *Anaerobe.* 4: 145-152.
- Bryant, M. P., I. M. Robinson. 1961. An improved nonselective culture medium for ruminal bacteria and its use in determining diurnal variation in numbers of bacteria in the rumen. *J. Dairy Sci.* 44: 1446-1456.

- Craig, W. M., G. A. Broderick, D. B. Ricker. 1987. Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. *J. Nutr.* 117: 56-62.
- Denman, S. E., C. S. McSweeney. 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.
- Giraldo, L. A., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, M. D. Carro. 2008. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141: 306-325.
- Hungate, R. E. 1966. *The rumen and its microbes*. Academic Press. Nueva York, EEUU
- Leedle, J. A., M. P. Bryant, R. B. Hespell. 1982. Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low- or high-forage diets. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 402-412.
- Martin, C., E. Devillard, B. Michalet-Doreau. 1999. Influence of sampling site on concentrations and carbohydrate-degrading enzyme activities of protozoa and bacteria in the rumen. *J. Anim. Sci.* 77: 979-987.
- Martin, C., B. Michalet-Doreau, G. Fonty, A. Williams. 1993. Postprandial variations in the activity of polysaccharide-degrading enzymes of fluid- and particle-associated ruminal microbial populations. *Curr. Microbiol.* 27: 223-228.
- Michalet-Doreau, B., M. Doreau. 2001. Influence of drastic underfeeding on ruminal digestion in sheep. *Anim. Res.* 50: 451-462.
- Ramos, S., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, M. E. Martinez, C. Saro, M. D. Carro. 2009. Influence of detachment procedure and diet on recovery of solid-associated bacteria from sheep ruminal digesta and representativeness of bacterial isolates as assessed by automated ribosomal intergenic spacer analysis-polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* 92: 5659-5668.
- Ranilla, M. J., M. D. Carro. 2003. Diet and procedures used to detach particle-associated microbes from ruminal digesta influence chemical composition of microbes and estimation of microbial growth in rusitec fermenters. *J. Anim. Sci.* 81: 537-544.
- Sharma, R., S. J. John, M. Damgaard, T. A. McAllister. 2003. Extraction of PCR quality plant and microbial DNA from total rumen contents. *BioTechniques.* 34: 92-97.
- Stewart, C. S. 1977. Factors affecting the cellulolytic activity of rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 497-502.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, L. M. Rode. 2001. Effect of dietary factors on distribution and chemical composition of liquid- or solid-associated bacterial populations in the rumen of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 79: 2736-2746.
- Yu, Z., M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques.* 36: 808-812.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN GENERAL

El rumen es un ecosistema microbiano anaerobio muy complejo, en el que habitan diferentes poblaciones de bacterias, hongos, protozoos y arqueas. Estas poblaciones varían ampliamente en función de numerosos factores, entre los que destaca, por su importancia, la dieta que recibe el animal. Además, existen grandes diferencias tanto en composición química como en función metabólica entre las bacterias asociadas a la fase líquida y las asociadas a la fase sólida de la digesta ruminal (Ipharraguerre *et al.*, 2007). Sin embargo, los estudios relativos a la composición de las comunidades microbianas ruminales se han visto limitados debido al hecho de que una gran parte de los microorganismos ruminales no pueden ser estudiados mediante las técnicas de cultivo tradicionales. En los últimos años se han empezado a aplicar técnicas moleculares al estudio de las poblaciones microbianas ruminales. Algunos de los estudios realizados hasta el momento han combinado técnicas de PCR (*polymerase chain reaction*) con otras como DGGE (*denaturing gel gradient electrophoresis*), T-RFLP (*terminal-restriction fragment length polymorphism*) y ARISA (*automated ribosomal intergenic spacer analysis*). Estas técnicas posibilitan el estudio de la biodiversidad de los grupos microbianos del rumen (hongos, protozoos, bacterias y arqueas), así como profundizar en el conocimiento de los mismos. Otras técnicas, como la PCR cuantitativa (qPCR) permiten cuantificar los principales grupos microbianos.

La mayoría de los estudios realizados hasta el momento con el objetivo de analizar las comunidades microbianas ruminales se han llevado a cabo en el ganado vacuno, debido fundamentalmente a su mayor relevancia económica e importancia a escala mundial. Sin embargo, son todavía escasos los estudios realizados en el ganado ovino. Por ello, el objetivo fundamental de la presente Tesis Doctoral fue examinar el efecto de la dieta sobre las comunidades microbianas del rumen de ovejas. Para ello se realizó en primer lugar un estudio sobre la diversidad bacteriana en el rumen de ovejas que recibían cuatro dietas diferentes. A partir de los resultados de este estudio se seleccionaron dos dietas con las que se llevó a cabo una segunda prueba para analizar su efecto sobre las comunidades microbianas que habitan las fases líquida y sólida de la digesta del rumen. Asimismo, se realizó un trabajo metodológico en el que se comparó la idoneidad de dos técnicas moleculares de huella genética para el estudio de la diversidad de las comunidades bacterianas. Finalmente, en la Memoria se incluye un trabajo complementario en el que, con las mismas dietas, se analizó la contribución proporcional de las fases líquida y sólida a la población total bacteriana y a

la actividad fibrolítica ruminal. En todas las pruebas las dietas se administraron a un nivel restringido para evitar la selección por los animales.

Como se ha comentado, la composición de las comunidades bacterianas que pueblan el rumen está afectada por diversos factores y uno de los principales es la dieta que recibe el animal. Por ello, y en el marco de una prueba de valoración nutritiva que estaba llevándose a cabo en el Departamento de Producción Animal, se planteó analizar el efecto de la dieta sobre la diversidad bacteriana en las fases sólida y líquida del rumen. En este estudio cuatro ovejas recibieron cuatro dietas en un diseño de cuadrado latino. Las dietas diferían en la relación forraje:concentrado (70:30 y 30:70) y en el tipo de forraje (heno de alfalfa y heno de gramíneas) y se formularon para ser representativas de las que recibe en la práctica el ganado ovino en las actuales condiciones productivas. En cada oveja se aislaron pellets de bacterias asociadas a la fase sólida (SAB) y líquida (LAB) inmediatamente antes de la administración de alimento y se evaluó su diversidad utilizando ARISA. El número de picos y el índice de Shannon fueron mayores en los pellets SAB de las ovejas que recibían las dietas con elevado contenido en forraje (70% de forraje) que en aquellas que recibían la dieta con alto contenido en concentrado (30% de forraje). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Larue *et al.* (2005), quienes observaron que la diversidad bacteriana en las SAB tendía a ser mayor cuando las ovejas eran alimentadas con una dieta compuesta únicamente por forraje que cuando en la dieta se incluía un 30% de concentrado. Además, en el número de picos y el índice de Shannon fueron mayores que en las ovejas que recibían las dietas con heno de gramíneas que en aquellas que recibían las dietas con heno de alfalfa. Este hecho está de acuerdo con los resultados de Koike *et al.* (2003) quienes observaron que las bacterias aisladas del heno de dactilo eran diferentes de las aisladas del heno de alfalfa cuando ambos forrajes fueron incubados *in sacco* en el rumen de ovejas y se clonaron los genes que codifican para la subunidad 16S del ribosoma bacteriano, concluyendo que el tipo de forraje podría afectar a las bacterias asociadas a las partículas fibrosas en el rumen.

Por el contrario, el número de picos e índice de Shannon de las LAB no se vieron afectados por la relación forraje:concentrado ni por el tipo de forraje en la dieta. Sin embargo, Kocherginskaya *et al.* (2001) realizaron un estudio en el cual terneros alimentados solamente con maíz presentaban mayor diversidad bacteriana en el líquido ruminal que los alimentados con forraje. Es posible que los resultados se vean afectados por la composición y

características de los forrajes y concentrados utilizados en los diferentes estudios. Los resultados obtenidos relativos al número de picos e índice de Shannon en las SAB y las LAB se confirmaron con los dendrogramas y los análisis de componentes principales (PCA) realizados. Por ello, la conclusión de este estudio fue que la diversidad bacteriana de los pellets de SAB estuvo afectada por la proporción de forraje en la dieta y por el tipo de forraje por el que estaba constituida la misma, mientras que la estructura de las comunidades de LAB no fue afectada por ninguno de los dos factores. Estos resultados indicarían que las características de la dieta afectan en mayor medida a las SAB que a las LAB. Además los resultados de esta prueba indican que el tipo de forraje en la dieta influye más sobre la diversidad de las comunidades bacterianas que la proporción forraje:concentrado. Existen estudios similares realizados en vacas (Martin *et al.*, 1993; 2001) y en ovejas (Michalet-Doreau *et al.*, 2001), aunque la mayoría de ellos están enfocados a analizar el efecto en las poblaciones ruminales de la inclusión de elevadas cantidades de concentrado en la dieta y realmente existe poca información sobre la influencia del tipo de forraje de la misma.

Debido a la escasez de información sobre la influencia del tipo de forraje en la dieta en la población microbiana ruminal, se decidió continuar realizando estudios en los que se utilizaran las dos dietas con un 70% de forraje y que contenían heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) como forraje. En estas pruebas se caracterizaron las poblaciones microbianas del rumen de ovejas en tres momentos del periodo posprandial, ya que las comunidades microbianas sufren cambios tras la ingestión de alimento. Se diseñó una prueba en la que se evaluó el efecto de la dieta sobre las comunidades microbianas del rumen en las fases sólida y líquida de la digesta y sus variaciones durante el periodo posprandial, poniendo especial atención a las comunidades fibrolíticas. En esta prueba, cuatro ovejas recibieron las dos dietas en dos periodos en un diseño cruzado y se realizaron muestreos del contenido ruminal justo antes de la administración del alimento y a las 4 y 8 horas tras la misma, separándose las fracciones líquida y sólida. En cada una de ellas se cuantificó mediante qPCR la cantidad de ADN de bacterias y protozoos, para cada dieta y tiempo de muestreo. Además se realizó la cuantificación relativa, respecto al total de bacterias, de las tres especies de bacterias fibrolíticas predominantes (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*) y de los hongos. En las muestras de la fase líquida se cuantificó también la abundancia relativa de las arqueas metanogénicas. La diversidad bacteriana

fue evaluada mediante ARISA y para completar la información obtenida se analizaron los principales parámetros ruminales (pH, concentración de ácidos grasos volátiles, amoníaco y lactato) y la actividad enzimática. Asimismo, se realizó un recuento microscópico del número de protozoos en el líquido ruminal, con la finalidad de comparar estos resultados con los obtenidos mediante qPCR.

Uno de los problemas que presentan las muestras de digesta ruminal es la presencia de inhibidores de la PCR. Por ello, en primer lugar se realizaron diversas pruebas para intentar aislar ADN de buena calidad. Al final de estas pruebas, que no se describen en esta Memoria de Tesis Doctoral, se decidió extraer el ADN por duplicado y utilizar en todos los casos bromuro de cetiltrimetilamonio para reducir la presencia de inhibidores. Las concentraciones de ADN obtenidas tras la extracción, tanto en el contenido sólido como en la fase líquida estuvieron dentro de los rangos señalados anteriormente en la literatura. Las concentraciones de ADN en la fase sólida oscilaron entre 19,8 y 76,1 μg de ADN por g de materia fresca (MF). Sharma *et al.* (2003) obtuvieron valores entre 25 y 30 μg por g de MF de contenido ruminal de oveja y Yu y Morrison (2004) entre 25 y 164 μg de ADN por g de MF de contenido ruminal de vacuno, utilizando para ello diferentes técnicas. Las concentraciones de ADN fueron mayores en las muestras obtenidas a las 4 horas tras la administración del alimento que en las obtenidas a las 0 y 8 horas, lo que se atribuyó a un mayor contenido de ADN vegetal en estas muestras. La relación entre absorbancias a 260 y 280 nm (A_{260}/A_{280}) osciló entre 1,72 y 1,98, no estando afectada ni por el tipo de forraje ni por el tiempo de muestreo. Las concentraciones de ADN en la fase líquida oscilaron entre 2,06 y 3,34 μg de ADN por mL de fluido ruminal y fueron similares a las encontradas por Broudiscou *et al.* (1998) en ovejas (de 2,61 a 3,95 μg de ADN por mL de fluido ruminal). En la fase líquida las concentraciones de ADN fueron menores a las 4 horas tras la alimentación, que a las 0 y 8 horas. La relación de absorbancias (A_{260}/A_{280}) varió entre 1,72 y 2,00, no estando influida tampoco por el tipo de forraje o el tiempo de muestreo.

La concentración de ADN bacteriano en las muestras de la fase sólida y líquida de la digesta ruminal se evaluó mediante qPCR. No se observaron interacciones significativas entre el tipo de forraje y el tiempo de muestreo en ningún caso, lo que indicaría variaciones posprandiales de la concentración de ADN bacteriano similares para ambas dietas. Además, en ambos casos las concentraciones fueron similares en las dos dietas y estuvieron afectadas por

el tiempo de muestreo. Tanto en la fase sólida como en la fase líquida de la digesta, la concentración de ADN bacteriano fue menor a las 4 horas tras la alimentación, no existiendo diferencias entre los valores observados a las 0 y a las 8 horas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Leedle *et al.* (1982), quienes cuantificaron las bacterias en el contenido ruminal completo de vacas mediante técnicas de recuento clásicas y observaron que el número de bacterias fue más elevado al final del periodo posprandial y el más bajo a las dos horas tras la administración del alimento. También obtuvieron resultados en la misma línea Michalet-Doreau *et al.* (2002) en ovejas utilizando hibridación *dot-blot*, Martin y Michalet-Doreau (1995) en ovejas utilizando ^{15}N como marcador microbiano, y Bryant y Robinson (1961) en terneros utilizando técnicas de cultivo clásicas. Por el contrario, Briesacher *et al.* (1992) cuantificaron la cantidad de ARN ribosómico 16S en la fase sólida del contenido ruminal en toros y observaron que aumentaba al hacerlo el tiempo tras la ingestión del alimento. Estos autores atribuyeron este incremento a la colonización bacteriana de las partículas de alimento. En los estudios anteriores (excepto en el de Leedle *et al.*, 1982) los animales eran alimentados dos veces al día a un nivel restringido (mantenimiento o un 80% de lo ingerido *ad libitum*), mientras que en el estudio de Briesacher *et al.* (1992) los animales recibían el alimento *ad libitum*. En nuestro estudio las ovejas recibieron el alimento dos veces al día a un nivel restringido y ese alimento fue consumido por completo en la primera hora tras la administración, por lo que la disminución en la concentración de ADN bacteriano observada entre las 0 y las 4 horas en el sólido y en el líquido podría haber sido debida, en parte, al efecto dilución del contenido ruminal por el alimento, el agua de bebida y la saliva, tal y como han señalado Leedle *et al.* (1982) y Martin *et al.* (2001). Debe tenerse en consideración que las concentraciones de bacterias ruminales son el balance entre el crecimiento bacteriano y su lisis, la dilución por el alimento y agua, y el turnover de partículas en el rumen, factores que están altamente influidos por el nivel de y el patrón de ingestión (Leedle *et al.*, 1982; Michalet-Doreau *et al.*, 2002).

Las actividades enzimáticas fibrolíticas (carboximetilcelulasa, avicelasa y xilanasa) en la fase sólida del rumen fueron mayores antes de la alimentación que a las 8 y 4 horas, con la excepción de la actividad avicelasa en la dieta AL que permaneció invariable en el tiempo. Además, la actividad xilanasa fue más elevada cuando las ovejas recibieron la dieta GR, pudiendo este hecho ser atribuido al mayor contenido de hemicelulosa de dicha dieta. En cambio, en la fase líquida de la digesta, las actividades

carboximetilcelulasa y avicelasa fueron mayores en la dieta AL. Las actividades carboximetilcelulasa y xilanasas en la fase líquida también fueron mayores justo antes de la administración del alimento que a las 4 y 8 horas tras la misma. Estos resultados, tanto en la fase sólida como en la líquida, están de acuerdo con los obtenidos por otros autores. Martin *et al.* (1993) observaron que la actividad fibrolítica en el rumen de vacas disminuía tras la alimentación y alcanzaba sus valores máximos al final del periodo posprandial. En otro estudio de los mismos autores (Martin *et al.*, 1999) se puso de manifiesto que la actividad enzimática fibrolítica en la fase sólida del rumen de vacas era mayor una hora antes de la administración del alimento que en fases posteriores a la ingestión, independientemente de la dieta administrada. La adherencia de los microorganismos a las partículas de alimento es un hecho indispensable para comenzar a producirse enzimas fibrolíticas que degraden la pared vegetal. Hasta que se comienzan a producir enzimas se requiere un período de tiempo, el que transcurre entre la llegada del alimento al rumen y su degradación. Además, algunos estudios *in vitro* han demostrado que algunas enzimas fibrolíticas se comienzan a secretar tras varias horas de incubación de los sustratos (Malburg *et al.*, 1997; Flint *et al.*, 1999). En nuestro estudio, la concentración de ADN bacteriano no estuvo correlacionada con la magnitud de la actividad enzimática ni en las muestras de la fase sólida ni de la fase líquida. Este hecho podría deberse a la amplia variedad de bacterias que componen la comunidad bacteriana total, muchas de las cuales no producen enzimas fibrolíticas.

Las concentraciones de ADN protozoario no difirieron entre dietas ni en la fase sólida ni en la fase líquida. En el fluido ruminal no se detectaron diferencias en función del tiempo de muestreo, mientras que en las muestras de la fase sólida la concentración de ADN protozoario fue mayor a las 4 horas tras la alimentación que a las 0 y 8 horas. Dehority y Orpin (1997) y Santra *et al.* (1998) obtuvieron resultados en los que el número de protozoos (determinado mediante recuento microscópico) disminuía en el líquido tras la alimentación y lo atribuyeron a una migración de protozoos para colonizar las partículas ruminales. En nuestro experimento, el número de protozoos en el líquido ruminal determinado mediante recuento al microscopio fue menor a las 4 y 8 horas que a las 0 horas, confirmando el hecho de que el aumento de protozoos en el sólido pueda ser debido por la migración de estos desde la fase líquida. Además, esta disminución podría ser debida a un efecto dilución con el agua y la saliva que entran en el rumen tras la alimentación, y

también a la lisis celular que puede ocurrir al descender el pH ruminal de los niveles observados a las 0 horas. Esta lisis celular puede hacer aumentar la cantidad de ADN protozoario presente en las muestras, pero la célula lisada no se determinaría en el conteo al microscopio. Este hecho puede contribuir a la falta de diferencias observada entre tiempos de muestreo cuando se utilizó la PCR en tiempo real (Skillman *et al.*, 2006). Este hecho puede también ayudar a explicar la falta de correlación observada entre la concentración de ADN protozoario y el número de protozoos determinado por recuento al microscopio observada en nuestro estudio.

La cuantificación de las tres especies de bacterias fibrolíticas más representativas (*Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* y *Fibrobacter succinogenes*), así como de los hongos en las fases sólida y líquida de la digesta y la de las arqueas en la fase líquida se realizó de forma relativa a la cantidad absoluta de ADN bacteriano. La cuantificación relativa de microorganismos es un método muy utilizado, ya que elimina la necesidad de disponer de un estándar de cada microorganismo y reduce el número de reacciones de PCR necesarias. Las concentraciones de ADN de los dos ruminococos en la fase sólida no variaron con la dieta ingerida por los animales, pero la abundancia relativa de *F. succinogenes* fue mayor cuando las ovejas consumían la dieta GR. En cambio, en las muestras de fase líquida tanto *F. succinogenes* como *R. flavefaciens* fueron más abundantes en la dieta GR. En la fase líquida se observaron diferentes cambios posprandiales con las dos dietas; en las ovejas alimentadas con AL las abundancias relativas de *F. succinogenes* y *R. flavefaciens* permanecieron relativamente constantes en el tiempo, mientras que la abundancia de *R. albus* aumentó al doble a las 4 horas tras la alimentación aunque este aumento no alcanzó la significación estadística, debido a la elevada variabilidad entre animales. En cambio, con la dieta GR las tres bacterias vieron aumentada su abundancia relativa a las 4 horas tras la alimentación. En las muestras de la fase sólida las tres bacterias celulolíticas vieron aumentada su concentración relativa a las 4 horas, sin encontrarse diferencias entre los valores observados a las 0 y 8 horas. Estos resultados sugieren que las poblaciones celulolíticas, especialmente en la fase sólida, fueron estimuladas por la llegada al rumen de alimento fibroso, aunque en la fase líquida el efecto dependió del tipo de forraje. Martin *et al.* (2001) analizaron el efecto de la suplementación de la dieta con cebada en la población de bacterias fibrolíticas asociada a la fase sólida del rumen y observaron que las concentraciones de *F. succinogenes* y *R. flavefaciens* disminuyeron por la inclusión de la cebada en la dieta, mientras que la

concentración de *R. albus* aumentó. Las concentraciones de las tres poblaciones de bacterias celulolíticas analizadas en el estudio a lo largo del periodo posprandial en la fase sólida de la digesta ruminal estuvieron correlacionadas positivamente entre sí, al igual que en los resultados obtenidos por Michalet-Doreau *et al.* (2001). Estas relaciones indicarían una evolución similar de las tres especies bacterianas en función de las condiciones ruminales. *F. succinogenes* fue la bacteria más abundante de las tres celulolíticas, tanto en la fase sólida como en la líquida, exceptuando en las muestras de la fase líquida tomadas 4 horas tras la alimentación, en las que la abundancia de *R. flavefaciens* fue similar a la de *F. succinogenes*. Estos resultados concuerdan con otros estudios en los que esta bacteria fue la más abundante, independientemente de la dieta administrada en el rumen de ovejas (Koike y Kobayashi, 2001; Michalet-Doreau *et al.*, 2001; 2002; Koike *et al.*, 2003; Mosoni *et al.*, 2011), cultivos *in vitro* de microorganismos ruminales inoculados con fluido ruminal procedente de ovejas (Chen *et al.*, 2008) y en el rumen de búfalos (Wanapat y Cherdthong, 2009). Todos estos resultados indicarían la importancia ecológica y funcional de *F. succinogenes* entre las especies celulolíticas del rumen. Por contra Martin *et al.* (2001) utilizando hibridación *dot-blot* observaron que la bacteria celulolítica más abundante era *R. albus* y Tajima *et al.* (2001) utilizando qPCR observaron que *R. flavefaciens* y *F. succinogenes* tenían mayores concentraciones que *R. albus*. Las diferencias encontradas en las poblaciones relativas de estas tres especies celulolíticas entre diferentes estudios podrían ser debidas a los diferentes técnicas utilizadas para medir la concentración de ADN bacteriano o a las poblaciones ruminales específicas de cada animal (Michalet-Doreau *et al.*, 2001). En las muestras de la fase sólida no se observó correlación entre la abundancia de las tres especies de bacterias celulolíticas y las actividades enzimáticas fibrolíticas, lo que estaría de acuerdo con el hecho antes expuesto de que las bacterias tardan un tiempo desde que colonizan la fibra hasta que comienzan a producir enzimas para su degradación. Michalet-Doreau *et al.* (2002) tampoco encontraron correlación entre la abundancia de las bacterias celulolíticas y la actividad enzimática fibrolítica. Estos autores apuntaron el hecho de que las técnicas moleculares no ofrecen información sobre viabilidad, actividad metabólica o estado de crecimiento de las bacterias evaluadas, factores importantes en la producción de enzimas por parte de las mismas. El valor del pH tampoco estuvo correlacionado con la abundancia de las especies celulolíticas. Un estudio de Russell y Dombrowski (1980) señaló que las bacterias celulolíticas analizadas en

nuestro estudio no son capaces de crecer a pH inferiores a 6,0. En nuestro estudio el pH siempre estuvo por encima de 6,2 lo que podría explicar la falta de relación observada entre el pH ruminal y la abundancia relativa de bacterias celulolíticas. En el caso de la fase líquida las poblaciones microbianas analizadas no estuvieron correlacionadas con casi ninguno de los parámetros ruminales analizados, concordando con los resultados obtenidos por Weimer *et al.* (1999) en un estudio llevado a cabo en vacuno. En cuanto a la actividad enzimática en la fase líquida, la actividad xilanasas fue la única que estuvo positivamente correlacionada con la concentración de algunas poblaciones microbianas, aunque no mostró correlación con ninguna de las tres bacterias celulolíticas.

En el caso de las arqueas metanogénicas, analizadas en la fase líquida, su evolución a lo largo del periodo posprandial fue diferente para las dos dietas, ya que mientras con la dieta GR no se observaron variaciones posprandiales en su concentración, cuando las ovejas recibieron la dieta AL las concentraciones disminuyeron significativamente a las 4 horas tras la ingestión. Sin embargo, no se observaron diferencias en las abundancias relativas debidas al tipo de forraje administrado en la dieta. La abundancia relativa de los hongos en relación a la cantidad de bacterias totales en la fase sólida fue superior en las ovejas alimentadas con GR que en las que consumían la dieta AL y para ambas dietas los valores fueron superiores a las 4 horas tras la alimentación. En la fase líquida de la digesta, la abundancia relativa de hongos fue también mayor con la dieta GR, pero la evolución posprandial difirió entre las dos dietas; mientras que con la dieta AL no se observaron cambios posprandiales, la abundancia relativa de hongos con la dieta GR aumentó a las 4 horas tras la alimentación. A pesar de que el conocimiento sobre las poblaciones de hongos que pueblan el rumen es todavía limitado, es conocido su papel como degradadores de la fibra y son considerados por algunos autores como colonizadores de la misma (Edwards *et al.*, 2008). Joblin *et al.* (1989) obtuvieron resultados que indicaban que la solubilización del material fibroso de las plantas por los hongos era de mayor magnitud que por las bacterias fibrolíticas. De hecho existen estudios que prueban que las partículas de forraje son colonizadas por los hongos a los 15-20 min de su incubación (Orpin, 1977; Ho *et al.*, 1988), lo que concuerda con nuestros resultados de mayores valores a las 4 horas tras la ingestión y de valores muy bajos en la fase líquida de la digesta.

En resumen, las poblaciones microbianas en la digesta ruminal son muy dinámicas durante el periodo posprandial. En la fase sólida, se observó

una disminución de la concentración de ADN bacteriano a las 4 horas tras la ingestión, pero la concentración de ADN protozoario aumentó. Estos cambios posprandiales fueron similares para las dos dietas. Las abundancias relativas de las tres bacterias fibrolíticas analizadas y de los hongos en la fase sólida de la digesta aumentaron a las 4 horas tras la alimentación y *F. succinogenes* fue la más abundante de las tres bacterias celulolíticas determinadas. En el caso de la fase líquida tanto la concentración de ADN bacteriano, como el número de protozoos fueron menores a las 4 horas tras la alimentación. En este caso, se observaron diferencias entre ambas dietas para las abundancias relativas de *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* y hongos, que fueron superiores con la dieta GR.

La siguiente prueba tuvo como objetivo la comparación de dos técnicas moleculares frecuentemente utilizadas para evaluar la diversidad microbiana en el ecosistema ruminal, en concreto ARISA y DGGE. La DGGE se basa en las diferencias en la secuencia de nucleótidos en el ADN para diferenciar las especies microbianas, mientras que el ARISA separa las diferentes especies en función de la longitud del fragmento entre los genes que codifican para las subunidades 16S y 23S del ribosoma. En este estudio, ambas técnicas se utilizaron para analizar la diversidad bacteriana de las muestras de la fase sólida y líquida del rumen. En la fase sólida del contenido ruminal el número medio de picos para los diferentes tratamientos experimentales con el ARISA osciló entre 20,0 y 50,8, siendo mayor cuando las ovejas eran alimentadas con AL que cuando recibían la dieta GR. Cuando la diversidad bacteriana se analizó mediante la DGGE el número medio de bandas obtenido en las imágenes de los geles osciló entre 9,0 y 12,8, pero también fue mayor cuando las ovejas eran alimentadas con la dieta AL. Estos resultados indican que ambas técnicas detectaron diferencias similares entre forrajes. Sin embargo, con el ARISA el número de picos fue menor a las 4 horas tras la administración del alimento que a las 0 y 8 horas para ambas dietas, mientras que no se detectaron diferencias debidas al tiempo de muestreo con DGGE. En consonancia con estos resultados varios autores han encontrado que la diversidad bacteriana está afectada por el tipo de dieta, pero los resultados son contradictorios. Larue *et al.* (2005) reportaron que la diversidad bacteriana en el rumen era mayor en ovejas alimentadas solamente con heno que en las que recibían el mismo heno suplementado con un 33% de concentrado. Petri *et al.* (2012) en terneros y Kocherginskaya *et al.* (2001) en ovejas encontraron mayor diversidad en la comunidad bacteriana del rumen cuando los animales eran alimentados con una dieta con alto

contenido en concentrado que cuando la dieta tenía una elevada proporción de forraje. En cambio, Julien *et al.* (2010) no observaron diferencias en cuanto a diversidad bacteriana en vacas que recibían dietas con diferentes relaciones forraje:concentrado.

Al analizar mediante ARISA la diversidad bacteriana en las muestras de la fase líquida el número medio de picos osciló entre 38,5 y 52,0 y fue, al igual que en la fase sólida, la dieta AL la que promovió una mayor diversidad bacteriana. Cuando se utilizó DGGE el número medio de bandas obtenido en las imágenes de los geles osciló entre 8,8 y 14,3, y también fue mayor con la dieta AL que con la dieta GR. Con el análisis por DGGE no se observaron efectos del tiempo de muestreo, pero con ARISA se observó un descenso del número de picos a las 4 horas tras la alimentación con la dieta GR y a las 8 horas con la dieta AL. Estos valores podrían sugerir una sutil diferencia entre las variaciones posprandiales de las comunidades bacterianas con los dos tipos de forrajes, pero no se observaron interacciones significativas del forraje con el tiempo de muestreo.

Al realizar dendrogramas individuales para todas las muestras recogidas en cada oveja, en general las muestras se agruparon en primer lugar en función de la fase ruminal (sólida y líquida), siendo más clara esta separación al utilizar los datos de la DGGE.

Con las muestras del ARISA se realizó un análisis de componentes principales (PCA) y se construyeron los gráficos por separado en función de tiempo de muestreo; en la fase sólida se observó que no existía un patrón claro de agrupamiento a las 0 horas mientras que a las 4 horas las muestras de ambos forrajes se agrupaban por separado. A las 8 horas las cuatro muestras de la dieta AL se agruparon juntas, pero las muestras de la dieta GR mostraron una gran dispersión. En las muestras de la fase líquida se observó una evolución similar, no observándose una separación clara de las muestras de ambas dietas a las 0 horas y un agrupamiento más claro a las 4 horas.

El hecho de obtener mayor número de picos con el ARISA que con la DGGE concuerda con los resultados obtenidos por otros autores. En un estudio en el que se compararon tres técnicas moleculares para analizar la diversidad bacteriana en muestras de suelo, el ARISA resultó ser la técnica con la que se obtuvo mayor número de picos, en comparación con el polimorfismo de la longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP) y la DGGE (Okubo y Sugiyama, 2009). En el caso de muestras

ruminales no se ha realizado una comparación directa utilizando las mismas muestras, pero Weimer *et al.* (2010) observaron un mayor número de picos en los electroferogramas del ARISA que en otros estudios en los que se utilizó el análisis de los fragmentos interribosomales (RISA; Larue *et al.*, 2005) o DGGE (Sadet *et al.*, 2007). El mayor número de picos observado con el ARISA podría ser debido a una mayor resolución de la técnica, al ser realizada la electroforesis en un capilar, y a la mayor sensibilidad para detectar el producto de la PCR marcado con fluorescencia. Sin embargo, hay que señalar que ambas técnicas detectaron diferencias similares entre las dos dietas de nuestro estudio, si bien el nivel de significación estadística fue mayor con el ARISA. A pesar del menor número de bandas detectado, la DGGE mostró una discriminación más clara entre muestras de la fase sólida y líquida cuando se construyeron dendrogramas para cada oveja. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Okubo y Sugiyama (2009), quienes observaron que la DGGE era la técnica más apropiada para discriminar entre cuatro tipos diferentes de suelo cuando se comparó con el ARISA y el T-RFLP.

Al realizar el PCA los resultados obtenidos son similares a los observados con los dendrogramas, discriminando mejor entre muestras de líquido y sólido cuando los gráficos se construyen con datos procedentes del análisis mediante DGGE. Una de las ventajas que presenta, *a priori*, la DGGE frente al ARISA es el hecho de que las bandas del gel se pueden aislar para posteriormente trabajar con ellas. Sin embargo, en la práctica, cuando el ecosistema en estudio es tan complejo como el rumen la reamplificación de una sola banda resulta muy difícil, ya que la muestra se contamina muy fácilmente con las bandas próximas. En resumen, el ARISA resultó ser una técnica más fácil de realizar y menos engorrosa que la DGGE y, por tanto, más apropiada para un análisis rápido de la diversidad bacteriana cuando se maneja un número elevado de muestras. La DGGE es una técnica que detecta grandes cambios entre muestras, pero puede no ser tan sensible cuando los cambios en las comunidades microbianas son más sutiles.

En el último estudio se utilizaron los valores obtenidos con qPCR para calcular la distribución de las bacterias ruminales entre las fases sólida y líquida de la digesta. El porcentaje de bacterias en la fase sólida se calculó estimando la cantidad de ADN bacteriano que se encuentra en 1 g de MF de contenido ruminal, a partir de los resultados de concentración obtenidos por g de materia seca (MS) cuando se trata de la digesta sólida o por mL en el caso de la digesta líquida. Para los cálculos se utilizó el porcentaje de MS en

el contenido ruminal que se determinó en el momento de recoger las muestras del rumen. El porcentaje de MS en el contenido ruminal no se vio afectado por el tipo de forraje administrado en la dieta, pero fue mayor a las 4 horas tras la administración del alimento debido, posiblemente, al alimento ingerido. Para ambas dietas y en los tres tiempos de muestreo, la cantidad de ADN bacteriano fue mayor en la fase sólida que en la líquida, representando el ADN bacteriano de la fase sólida entre el 82,3% y el 91,6% del total del ADN bacteriano del contenido ruminal. Estos valores están en el rango de los observados por otros autores (Craig *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 2001) en ganado vacuno que recibía dietas forrajeras y utilizando otras metodologías de medida. Nuestros resultados indican que la qPCR puede ser una técnica apropiada para este tipo de estudios.

En este estudio se realizaron cálculos similares a los descritos para las bacterias para estimar la contribución de las fases sólida y líquida de la digesta a la actividad enzimática total ruminal. Como era de esperar, todas las actividades determinadas fueron mayores en la fase sólida que en la fase líquida con las dos dietas. Las diferencias más marcadas se encontraron en la actividad xilanasas, en la que entre el 76 y el 86% de la actividad total se encontró en la fase sólida. En la fase sólida se encontró entre el 64 y el 80% de la actividad amilasa total y entre el 46 y el 67% de la actividad carboximetilcelulasa total. Estos resultados están de acuerdo con los de otros autores (Martin *et al.*, 1993, Michalet-Doreau *et al.*, 2001) y confirman que la mayor parte de la actividad enzimática fibrolítica y amilolítica en el rumen se debe a los microorganismos asociados a la fase sólida.

Tabla 5.1: Efecto del tipo de forraje (FOR) y el tiempo de muestreo (T) en las concentraciones totales de ADN bacteriano y protozoario en las fases sólida y líquida de la digesta del rumen de ovejas alimentadas con una dieta con una relación forraje:concentrado 70:30 y con heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) como forraje

| Parámetro y dieta | | Tiempo tras alimentación, h | | | EEM | FOR | Valor de P | |
|-------------------|--|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------|------|------------|---------|
| | | 0 | 4 | 8 | | | Tiempo | FOR x T |
| Sólido | Bacterias ($\mu\text{g DNA / g DM}$) | | | | | | | |
| | AL | 290 ^b | 179 ^a | 245 ^{ab} | 26,7 | 0,66 | 0,008 | 0,87 |
| | GR | 264 ^b | 180 ^a | 241 ^{ab} | | | | |
| Líquido | Bacterias ($\mu\text{g DNA / mL}$) | | | | | | | |
| | AL | 12,32 ^b | 5,78 ^a | 14,81 ^b | 1,622 | 0,89 | <0,001 | 0,75 |
| | GR | 13,35 ^b | 4,33 ^a | 14,70 ^b | | | | |
| Sólido | Protozoos ($\mu\text{g DNA / g DM}$) | | | | | | | |
| | AL | 0,23 ^a | 769,6 ^b | 0,06 ^a | 82,053 | 0,68 | <0,001 | 0,84 |
| | GR | 0,13 ^a | 685,7 ^b | 0,05 ^a | | | | |
| Líquido | Protozoos ($\mu\text{g DNA / mL}$) | | | | | | | |
| | AL | 11,27 | 7,45 | 18,11 | 4,526 | 0,06 | 0,25 | 0,56 |
| | GR | 23,32 | 15,67 | 20,26 | | | | |

Tabla 5.2: Efecto del tipo de forraje (FOR) y el tiempo de muestreo (T) en las abundancias relativas de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus* en las fases sólida y líquida de la digesta del rumen de ovejas alimentadas con una dieta con una relación forraje:concentrado 70:30 y con heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) como forraje

| Parámetro y dieta | | Tiempo tras alimentación, h | | | EEM | FOR | Valor de P | |
|-------------------|----------------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|---------|--------|------------|---------|
| | | 0 | 4 | 8 | | | Tiempo | FOR x T |
| Sólido | <i>Fibrobacter succinogenes</i> | | | | | | | |
| | AL | 0,06 ^a | 14,49 ^b | 0,11 ^a | 2,079 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| | GR | 0,09 ^a | 38,19 ^b | 0,14 ^a | | | | |
| Líquido | <i>Fibrobacter succinogenes</i> | | | | | | | |
| | AL | 0,064 | 0,044 | 0,037 | 0,0308 | 0,005 | 0,36 | 0,11 |
| | GR | 0,066 | 0,176 | 0,157 | | | | |
| Sólido | <i>Ruminococcus flavefaciens</i> | | | | | | | |
| | AL | 0,0004 ^a | 0,2992 ^b | 0,0004 ^a | 0,08216 | 0,40 | 0,004 | 0,51 |
| | GR | 0,0022 ^a | 0,4699 ^b | 0,0020 ^a | | | | |
| Líquido | <i>Ruminococcus flavefaciens</i> | | | | | | | |
| | AL | 0,0123 | 0,0093 | 0,0115 | 0,03196 | <0,001 | 0,24 | 0,21 |
| | GR | 0,0127 | 0,1843 | 0,0678 | | | | |
| Sólido | <i>Ruminococcus albus</i> | | | | | | | |
| | AL | 0,002 ^a | 0,751 ^b | 0,002 ^a | 0,1075 | 0,56 | <0,001 | 0,72 |
| | GR | 0,001 ^a | 0,597 ^b | 0,001 ^a | | | | |
| Líquido | <i>Ruminococcus albus</i> | | | | | | | |
| | AL | 0,038 | 0,078 | 0,034 | 0,0195 | 0,41 | 0,03 | 0,82 |
| | GR | 0,041 ^a | 0,105 ^b | 0,044 ^a | | | | |

5.1. Referencias bibliográficas

- Briesacher, S. L., T. May, K. N. Grigsby, M. S. Kerley, R. V. Anthony, J. A. Paterson. 1992. Use of DNA probes to monitor nutritional effects on ruminal prokaryotes and *Fibrobacter succinogenes* S85. *J. Anim. Sci.* 70(1): 289-295.
- Broudiscou, L., H. Geissler, A. Broudiscou. 1998. Estimation of the growth rate of mixed ruminal bacteria from short-term DNA radiolabeling. *Anaerobe.* 4(3): 145-152.
- Bryant, M. P., I. M. Robinson. 1961. An improved nonselective culture medium for ruminal bacteria and its use in determining diurnal variation in numbers of bacteria in the rumen. *J. Dairy Sci.* 44(8): 1446-1456.
- Chen, X. L., J. K. Wang, Y. M. Wu, J. X. Liu. 2008. Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid- and solid-associated ruminal microbes *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141(1-2): 1-14.
- Craig, W. M., G. A. Broderick, D. B. Ricker. 1987. Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. *J. Nutr.* 117(1): 56-62.
- Dehority, B. A., C. G. Orpin. 1997. Development of, and natural fluctuations in rumen microbial populations, en: *The rumen microbial ecosystems*. Hobson, P. N., C. S. Stewart, ed. Blackie Academic & Professional, Londres, Reino Unido.
- Edwards, J. E., A. H. Kingston-Smith, H. R. Jimenez, S. A. Huws, K. P. Skøt, G. W. Griffith, N. R. McEwan, M. K. Theodorou. 2008. Dynamics of initial colonization of nonconserved perennial ryegrass by anaerobic fungi in the bovine rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66(3): 537-545.
- Flint, H. J., V. Aurilia, J. Kirby, K. Miyazaki, M. T. Rincon-Torres, S. I. McCrea, J. C. Martin. 1999. Organization of plant cell wall degrading enzymes in the ruminal anaerobic bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Prevotella bryantii*, en: *Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation*. Ohmiya, K., K. Hayashi, Y. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita, S. Kimura, ed. Uni Publishers, Co. Ltd., Japón.
- Ho, Y. W., N. Abdullah, S. Jalaludin. 1988. Penetrating structures of anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. *J. Gen. Microbiol.* 134(1): 177-181.
- Ipharraguerre, I. R., S. M. Reynal, M. Liñeiro, G. A. Broderick, J. H. Clark. 2007. A comparison of sampling sites, digesta and microbial markers, and microbial references for assessing the postruminal supply of nutrients in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90(4): 1904-1919.
- Joblin, K. N., G. P. Campbell, A. J. Richardson, C. S. Stewart. 1989. Fermentation of barley straw by anaerobic rumen bacteria and fungi in axenic culture and in co-culture with methanogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 9(5): 195-197.
- Julien, C., J. P. Marden, C. Bonnefont, R. Moncoulon, E. Auclair, V. Monteils, C. Bayouthe. 2010. Effects of varying proportions of concentrates on ruminal-reducing power and bacterial community structure in dry dairy cows fed hay-based diets. *Animal.* 4(10): 1641-1646.

- Kocherginskaya, S. A., R. I. Aminov, B. A. White. 2001. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe*. 7(3): 119-134.
- Koike, S., Y. Kobayashi. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204(2): 361-366.
- Koike, S., J. Pan, Y. Kobayashi, K. Tanaka. 2003. Kinetics of *in sacco* fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *J. Dairy Sci.* 86(4): 1429-1435.
- Larue, R., Z. Yu, V. A. Parisi, A. R. Egan, M. Morrison. 2005. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and *rrs* gene sequencing. *Environ. Microbiol.* 7(4): 530-543.
- Leedle, J. A., M. P. Bryant, R. B. Hespell. 1982. Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low- or high-forage diets. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(2): 402-412.
- Malburg, S. R., L. M. Malburg, T. Liu, A. H. Iyo, C. W. Forsberg. 1997. Catalytic properties of the cellulose-binding endoglucanase F from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(6): 2449-2453.
- Martin, C., B. Michalet-Doreau, G. Fonty, A. Williams. 1993. Postprandial variations in the activity of polysaccharide-degrading enzymes of fluid- and particle-associated ruminal microbial populations. *Curr. Microbiol.* 27(4): 223-228.
- Martin, C., L. Millet, G. Fonty, B. Michalet-Doreau. 2001. Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community associated with rumen solid digesta. *Reprod. Nutr. Dev.* 41(5): 413-424.
- Martin, C., E. Devillard, B. Michalet-Doreau. 1999. Influence of sampling site on concentrations and carbohydrate-degrading enzyme activities of protozoa and bacteria in the rumen. *J. Anim. Sci.* 77(4): 979-987.
- Martin, C., B. Michalet-Doreau. 1995. Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms: Effect of barley and buffer supplements. *J. Sci. Food Agric.* 67(3): 407-413.
- Michalet-Doreau, B., M. Doreau. 2001. Influence of drastic underfeeding on ruminal digestion in sheep. *Anim. Res.* 50(6): 451-462.
- Michalet-Doreau, B., I. Fernandez, C. Peyron, L. Millet, G. Fonty. 2001. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod. Nutr. Dev.* 41(2): 187-194.
- Michalet-Doreau, B., I. Fernandez, G. Fonty. 2002. A comparison of enzymatic and molecular approaches to characterize the cellulolytic microbial ecosystems of the rumen and the cecum. *J. Anim. Sci.* 80(3): 790-796.
- Mosoni, P., C. Martin, E. Forano, D. P. Morgavi. 2011. Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.* 89(3): 783-791.

- Okubo, A., S. Sugiyama. 2009. Comparison of molecular fingerprinting methods for analysis of soil microbial community structure. *Ecol. Res.* 24(6): 1399-1405.
- Orpin, C. G. 1977. Invasion of plant tissue in the rumen by the flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen. Microbiol.* 98(2): 423-430.
- Petri, R. M., R. J. Forster, W. Yang, J. J. McKinnon, T. A. McAllister. 2012. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. *J. Appl. Microbiol.* In press.
- Russell, J. B., D. B. Dombrowski. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 39(3): 604-610.
- Sadet, S., C. Martin, B. Meunier, and D. P. Morgavi. 2007. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal.* 1(07): 939.
- Santra, A., S. A. Karim, A. S. Mishra, O. H. Chaturvedi, R. Prasad. 1998. Rumen ciliate protozoa and fibre utilization in sheep and goats. *Small Rumin. Res.* 30(1): 13-18.
- Sharma, R., S. J. John, M. Damgaard, T. A. McAllister. 2003. Extraction of PCR quality plant and microbial DNA from total rumen contents. *BioTechniques.* 34: 92-97.
- Skillman, L. C., A. F. Toovey, A. J. Williams, A. G. Wright. 2006. Development and validation of a real-time PCR method to quantify rumen protozoa and examination of variability between entodinium populations in sheep offered a hay-based diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(1): 200-206.
- Tajima, K., T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura, R. I. Aminov. 2001. 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 Microbiol. Lett.* 200(1): 67-72.
- Wanapat, M., A. Cherdthong. 2009. Use of real-time PCR technique in studying rumen cellulolytic bacteria population as affected by level of roughage in swamp buffalo. *Curr. Microbiol.* 58(4): 294-299.
- Weimer, P. J., D. M. Stevenson, D. R. Mertens. 2010. Shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat-depressing conditions. *J. Dairy Sci.* 93: 265-278.
- Weimer, P. J., G. C. Waghorn, C. L. Odt, D. R. Mertens. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82(1): 122-134.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, L. M. Rode. 2001. Effect of dietary factors on distribution and chemical composition of liquid- or solid-associated bacterial populations in the rumen of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 79(10): 2736-2746.
- Yu, Z., M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques.* 36: 808-812.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

-Primera: En ovejas que recibían dietas con diferente relación forraje:concentrado y tipo de forraje, la diversidad bacteriana en las bacterias asociadas a la fase sólida del rumen fue afectada por ambos factores, siendo mayor el efecto del tipo de forraje. La diversidad de las bacterias asociadas a la fase líquida no se vio afectada por ninguno de los dos factores analizados.

-Segunda: Las variaciones posprandiales en las poblaciones de bacterias, hongos, protozoos y bacterias fibrolíticas de la fase sólida del rumen fueron similares en ovejas alimentadas con dos dietas forrajeras que contenían heno de alfalfa o heno de gramíneas como forraje. Con las dos dietas, las concentraciones de ADN bacteriano disminuyeron a las cuatro horas tras la alimentación mientras que las concentraciones de ADN protozoario y la abundancia relativa de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y los hongos con respecto a las bacterias totales aumentaron a las cuatro horas tras la alimentación. En general, se detectaron pocas diferencias entre forrajes en la cantidad de microorganismos, pero las diferencias se observaron siempre en las primeras horas tras la alimentación y no se detectaron en tiempos más avanzados del período posprandial.

-Tercera: Las variaciones posprandiales en las poblaciones de bacterias y protozoos en la fase líquida de la digesta ruminal de ovejas alimentadas con dos dietas que contenían heno de alfalfa o heno de gramíneas como forraje fueron similares con ambas dietas y se observaron disminuciones en las concentraciones de ADN bacteriano y protozoario a las cuatro horas tras la ingestión de alimento. No se observaron cambios en el período posprandial en la abundancia relativa de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y hongos cuando las ovejas recibían la dieta con heno de alfalfa, pero se detectaron aumentos numéricos a las cuatro horas tras la ingestión de alimento cuando las ovejas recibían la dieta con heno de gramíneas. Las dos dietas promovieron diferencias en la mayoría de parámetros de fermentación, pero los cambios posprandiales en los mismos fueron similares con ambas dietas.

-Cuarta: En general se observaron pocas correlaciones entre las actividades enzimáticas xilanas, carboximetilcelulasa y amilasa de las fases sólida y líquida de la digesta y las concentraciones de ADN de los diferentes grupos microbianos analizados, lo que pudo ser debido a la complejidad de las poblaciones microbianas ruminales implicadas en la degradación de los hidratos de carbono de la dieta.

-Quinta: En el presente estudio, no se observó una correlación significativa entre el número de protozoos en el líquido ruminal determinado por recuento microscópico y la abundancia de ADN protozoario determinado mediante PCR en tiempo real.

-Sexta: Cuando se utilizaron el análisis automatizado de la región espaciadora intergénica ribosomal (ARISA) y la electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE) para analizar la diversidad bacteriana en muestras del contenido ruminal de ovejas alimentadas con dos dietas que diferían en el tipo de forraje, ambas técnicas detectaron diferencias similares entre forrajes, pero únicamente el ARISA detectó diferencias entre tiempos de muestreo en el período posprandial. El ARISA resultó ser una técnica más versátil que la DGGE y, por tanto, más apropiada para un análisis rápido y eficaz cuando se maneja un número elevado de muestras.

-Séptima: La cantidad de ADN bacteriano en la fase sólida de la digesta representó entre el 82% y el 92% del total de ADN bacteriano en el contenido ruminal de ovejas alimentadas con dietas forrajeras. La fase sólida del rumen contribuyó también en una gran proporción a la actividad enzimática total del rumen, en concreto en más del 75, 64 y 46% para las actividades xilanas, amilasa y carboximetilcelulasa, respectivamente.

-First: In sheep receiving diets differing in forage to concentrate ratio and type of forage, bacterial diversity in solid-associated bacteria was affected by both factors, and the effect of the type of forage was greater. Diversity of liquid-associated bacteria was not affected by either of the two analyzed factors.

-Second: Postprandial variations in bacterial, fungal, protozoal and fibrolytic bacteria populations in the solid phase of the rumen were similar in sheep fed two forage diets, with either alfalfa hay or grass hay as forage. With both diets, bacterial DNA concentrations decreased at four hours post-feeding, whereas protozoal DNA concentrations and relative abundance of *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* and fungi, relative to total bacterial DNA concentrations were greater four hours after feeding. In general, little differences in amount of microorganisms were detected between forages, but the differences were observed always in the first hours after feed administration and not in larger periods.

-Third: Postprandial variations in bacterial and protozoal populations in the liquid phase of ruminal digesta of sheep fed two diets with either alfalfa hay or grass hay as forage were similar in both diets and there was observed a decrease in bacterial and protozoal DNA concentration at four hours post-feeding. No changes were observed over the postprandial period in the relative abundance of *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* and fungi when the sheep received the alfalfa hay diet, but it increased at four hours after feeding when the sheep were fed the grass hay diet. Both diets promoted differences for most of fermentation parameters, but postprandial changes were similar in both diets.

-Fourth: In general, few correlations were observed between xylanase, carboxymethylcellulase and amylase enzymatic activities in the solid and liquid phase of the rumen digesta and DNA concentrations of the different microbial group analysed, which may have been due to the complexity of the microbial populations that degrade carbohydrates in the diet.

-Fifth: In the present study, no significant correlation was observed between the number of protozoa in ruminal fluid determined by optical counts and the abundance of protozoal DNA assessed by real-time PCR.

-Sixth: When automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were used for assessing bacterial diversity in ruminant samples from sheep fed two diets differing in the type of forage, both techniques detected similar differences between forages, but only ARISA detected differences over the postprandial period. ARISA was more versatile technique, and therefore, more appropriate for the rapid and efficient analysis of a large number of samples.

-Seventh: The amount of bacterial DNA in the solid phase of the digesta represented between the 82% and the 92% of total bacterial DNA in sheep fed two forage diets. Solid phase of rumen digesta also contributed in a great percentage to the whole enzymatic activity in the rumen, being, more than 75%, 64% and 46% for xylanase, amilase and carboxymethylcellulase activities, respectively.

CAPÍTULO 7

RESUMEN

SUMMARY

Se diseñaron varios experimentos con el fin de monitorizar las poblaciones microbianas en el rumen de ovejas a lo largo del periodo posprandial. El objetivo del primero fue analizar la diversidad bacteriana en pellets de bacterias aislados de las fases sólida (SAB) y líquida (LAB) de la digesta ruminal. Se utilizaron 4 dietas con proporciones forraje:concentrado 70:30 (HF) o 30:70 (HC) y con heno de alfalfa o heno de gramíneas como forraje. Estas dietas se les administraron a 4 ovejas canuladas en el rumen a un nivel restringido de ingestión (52 g de MS/kg de peso metabólico), con el fin de evitar la selección del alimento por parte de los animales. Se aislaron los pellet de SAB y LAB de cada oveja inmediatamente antes de la administración del alimento y se analizó la diversidad bacteriana mediante el análisis automatizado de la región espaciadora intergénica ribosomal (ARISA). Se detectaron un total de 168 picos en los electroferogramas del ARISA en los 32 pellets, con 6 picos encontrados solamente en las SAB y 8 solo en las LAB. Las SAB aisladas de animales alimentados con las dietas HF tuvieron un mayor número de picos e índices de Shannon que aquellas aisladas de ovejas alimentadas con las dietas HC ($P=0,03$ y $0,05$, respectivamente), y las SAB de ovejas alimentadas con heno de gramíneas tuvieron valores más elevados de ambos parámetros que aquellas de animales alimentados con heno de alfalfa ($P=0,002$ y $0,004$). Por el contrario, el perfil de las LAB no fue afectado ($P=0,23$ a $0,65$) ni por la relación forraje:concentrado ni por el tipo de forraje administrado en la dieta. Los resultados indican que las SAB están más marcadamente afectadas por las características de la dieta que las LAB, y el tipo de forraje tuvo una influencia más marcada en las comunidades bacterianas que la relación forraje:concentrado.

El objetivo del segundo estudio fue evaluar los cambios posprandiales de los microorganismos degradadores de la fibra y la actividad fibrolítica en la fase sólida de la digesta ruminal de ovejas alimentadas con dos dietas con elevado contenido en forraje. Se usaron 4 ovejas a las que se les administraron las dos dietas en un diseño cruzado. Las dietas experimentales contenían un 30% de concentrado y un 70% de heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) como forraje. A las ovejas se les administró el alimento en dos tomas a razón de 52 g de materia seca (MS) por kg de peso metabólico, y las muestras de la digesta sólida se tomaron a las 0, 4 y 8 h tras la administración del alimento por la mañana. Las concentraciones de ADN bacteriano y protozoario se determinaron mediante PCR cuantitativa (qPCR) y las concentraciones de ADN de hongos,

Fibrobacter succinogenes, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus* se determinaron de manera relativa a la cantidad absoluta de ADN bacteriano; además, se determinaron las actividades enzimáticas carboximetilcelulasa, xilanasa, avicelasa y amilasa. En general, los cambios posprandiales de las concentraciones de ADN de todas las poblaciones evaluadas fueron similares para ambas dietas. Las concentraciones de ADN bacteriano fueron menores ($P < 0,05$) en las muestras tomadas a las 4 h tras la alimentación comparado con las tomadas a las 0 y 8 h, mientras que las concentraciones de ADN protozoario y la abundancia relativa del ADN de hongos, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* y *R. albus* fueron mayores ($P < 0,05$) a las 4 h tras la alimentación. La diversidad bacteriana, evaluada mediante ARISA, fue menor ($P < 0,05$) a las 4 h tras la administración del alimento que a las 0 y 8 h. El pH ruminal y las actividades carboximetilcelulasa, avicelasa y xilanasa fueron menores ($P < 0,05$) a las 4 y 8 h tras la alimentación, comparado con los valores obtenidos a las 0 h, pero la actividad amilasa permaneció invariable ($P > 0,05$) a lo largo del ciclo alimentario. El tipo de forraje no afectó ($P = 0,40$ a $0,68$) ni a las concentraciones de ADN bacteriano ni protozoario determinadas mediante qPCR ni a la abundancia relativa de las dos especies de *Ruminococcus*. Por contra, las ovejas alimentadas con la dieta GR tuvieron mayor abundancia relativa de *F. succinogenes* ($P < 0,001$) y hongos ($P < 0,02$) que las que recibían la dieta AL. *F. succinogenes* fue la más abundante ($P < 0,05$) de las tres especies de bacterias celulolíticas en ambas dietas, no existiendo diferencias entre las abundancias relativas de las dos especies de *Ruminococcus* ($P = 0,27$ y $0,63$ para las dietas AL y GR, respectivamente). El pH ruminal y las actividades carboximetilcelulasa, avicelasa y amilasa no estuvieron afectadas ($P = 0,15$ a $0,69$) por el tipo de forraje, pero la actividad xilanasa fue superior ($P = 0,01$) en la dieta GR comparado con la dieta AL. No se encontró correlación ($P = 0,14$ a $0,97$) entre las actividades enzimáticas y las concentraciones de ADN de protozoos, hongos y las tres bacterias celulolíticas. Por el contrario, las concentraciones de ADN bacteriano estuvieron correlacionadas positivamente ($P = 0,04$ a $0,004$) con las actividades avicelasa, xilanasa y amilasa. En resumen, los cambios posprandiales en los parámetros evaluados fueron similares en ambas dietas, pero la influencia del tipo de forraje en la estructura de las comunidades bacterianas de la digesta sólida del rumen fue más evidente en las primeras horas tras la alimentación. Esto pone de manifiesto la influencia del tiempo al que realiza el muestreo cuando se investigan los efectos de la dieta en las comunidades microbianas y en la función del rumen.

El tercer estudio tuvo como objetivo evaluar los cambios que se producen en el fluido ruminal durante el ciclo alimentario en ovejas debido al tipo de forraje en la dieta. Las dietas experimentales, las ovejas, los muestreos y las determinaciones fueron los mismos que los descritos en la prueba anterior. Adicionalmente, se determinaron los parámetros de fermentación y la abundancia relativa de arqueas metanogénicas en relación al ADN bacteriano total. El pH ruminal, la concentración de lactato y la actividad xilanasas en el fluido ruminal no fueron afectados ($P=0,42$ a $0,69$) por el tipo de forraje pero las concentraciones de amoníaco y AGV totales, y las actividades carboximetilcelulasas y amilasa fueron mayores ($P<0,001$ a $0,04$) en los animales que consumían la dieta AL comparado con la dieta GR. El pH ruminal y las actividades carboximetilcelulasas y xilanasas disminuyeron ($P<0,05$) tras la alimentación, pero la actividad amilasa permaneció invariable ($P=0,82$) durante todo el periodo posprandial. El número total de protozoos en la fase líquida de la digesta ruminal, determinado mediante recuento al microscopio óptico fue mayor ($P=0,02$) en ovejas alimentadas con AL que en aquellas alimentadas con GR, pero las concentraciones de ADN protozoario determinadas mediante qPCR tendieron ($P=0,06$) a ser mayores en ovejas alimentadas con GR. No hubo correlación ($P=0,58$; $n=24$) entre los números de protozoos y la concentración de ADN protozoario. El tipo de forraje no afectó ($P=0,14$ a $0,89$) ni a la concentración de ADN bacteriano ni a las abundancias relativas de *R. albus* y arqueas metanogénicas. Las ovejas alimentadas con la dieta AL tuvieron menor ($P<0,001$ a $0,004$) abundancia relativa de *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* y hongos que las alimentadas con la dieta GR. En general, los cambios posprandiales observados en todas las poblaciones evaluadas en la fase líquida de la digesta fueron similares en ambas dietas. Las concentraciones de ADN bacteriano y protozoario disminuyeron ($P<0,05$) a las 4 h tras la alimentación pero recuperaron los valores iniciales a las 8 h. No se observó correlación ($P>0,05$) entre las actividades carboximetilcelulasas y xilanasas, y la concentración de ADN bacteriano o la abundancia relativa de las tres bacterias fibrolíticas. Por el contrario, la actividad xilanasas estuvo correlacionada positivamente ($P<0,05$) con los números de protozoos, las concentraciones de ADN protozoario y la abundancia relativa de arqueas metanogénicas. En general, hubo poco efecto del forraje en las concentraciones de ADN de los microorganismos determinados, así como en la actividad enzimática fibrolítica en la fase líquida y la evolución

posprandial de todos los parámetros determinados fue similar en ambas dietas.

El objetivo de la cuarta prueba fue evaluar la idoneidad de dos técnicas moleculares basadas en la huella genética para investigar los cambios posprandiales en las comunidades bacterianas de la fase sólida y líquida del rumen de ovejas alimentadas con dos dietas diferentes. Los dos métodos comparados fueron el ARISA y la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Las dietas experimentales, los animales y los tiempos de muestreo han sido descritos anteriormente. Cuando se utilizó el ARISA, el valor medio del número de picos osciló entre 20,0 y 50,8 para el sólido y entre 38,5 y 52,0 para el líquido. Con la DGGE, los valores medios de número de bandas oscilaron entre 9,0 y 12,8 para el sólido y entre 8,8 y 14,3 para el líquido. Al considerar el conjunto de muestras, los índices de Shannon variaron entre 2,99 y 3,95 con el ARISA, y entre 2,11 y 2,61 con la DGGE. Mientras la DGGE no detectó variaciones ($P>0,05$) en la diversidad bacteriana a lo largo del periodo posprandial ni en la fase sólida ni en la fase líquida, utilizando el ARISA se detectó una disminución ($P<0,05$) en el número de picos de las muestras de digesta sólida a las 4 h tras la alimentación. En las muestras de líquido, el número de picos fue inferior ($P<0,05$) a las 4 h tras la alimentación que a las 0 h en la dieta GR, pero no se observaron diferencias ($P=0,14$) en la dieta AL. Para ambas fases de la digesta, con la dieta AL se detectó un mayor número de picos ($P<0,05$) e índice de Shannon que con la dieta GR, con el ARISA y con la DGGE. A pesar del menor número de bandas detectadas con la DGGE, esta técnica presentó una separación clara entre muestras de sólido y líquido cuando se construyeron dendrogramas individualmente para cada oveja. En resumen, el ARISA fue una técnica más fácil y menos engorrosa que la DGGE, y por tanto más apropiada para un análisis rápido de un elevado número de muestras. La DGGE puede detectar cambios grandes en las comunidades bacterianas, pero puede no ser suficientemente sensible para detectar cambios más sutiles en las poblaciones.

Por último, los resultados de los estudios anteriores se utilizaron para estimar la contribución de las fases líquida y sólida de la digesta ruminal al total de ADN bacteriano en la misma y a la actividad enzimática fibrolítica. La proporción de bacterias en la digesta sólida osciló entre el 82,6% y el 91,3% del total de bacterias, y para ambos forrajes fue mayor ($P<0,05$) a las 4 h que a las 0 y 8 h tras la alimentación. Los resultados confirman que las bacterias asociadas a la fase sólida representan un

porcentaje mayor de la comunidad bacteriana en rumiantes alimentados con dietas forrajeras, e indican que el tipo de forraje no tiene influencia en su proporción. Todas las actividades enzimáticas medidas fueron mayores ($P < 0,001$) en el sólido comprado con el fluido ruminal. La actividad xilanasas determinada en la fase sólida constituyó un 75% de la actividad xilanasas total. Las actividades carboximetilcelulasas y amilasas en el SOL fueron un 46% y 64% del total, respectivamente. Estos resultados indican que en ovejas alimentadas con dietas forrajeras, una elevada proporción de la actividad fibrolítica está asociada con la digesta sólida del rumen.

Several studies were design with the aim of monitoring the microbial populations in the rumen of sheep during the postprandial period. The objective of the first study was to analyze bacterial diversity in bacterial pellets isolated from the solid (SAB) and liquid (LAB) phase of the rumen. Four ruminally cannulated sheep were fed 4 diets with forage:concentrate ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and either alfalfa hay or grass hay as forage (FOR). Diets were offered to the animals at a daily rate of 52 g of dry matter/kg body weight^{0.75}. SAB and LAB were isolated from each sheep immediately before feeding, and the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) was used to analyze bacterial diversity. A total of 168 peaks were detected in the ARISA electropherograms across the total 32 bacterial pellets, with 6 peaks only found in SAB and 8 found only in LAB. The SAB isolated from sheep fed HF diets had greater number of peaks and Shannon index than those from sheep fed HC diets ($P=0.03$ and 0.05 , respectively), and SAB from sheep fed grass hay diets had greater values of both parameters than those isolated from sheep receiving alfalfa hay diets ($P=0.002$ and 0.004). In contrast, LAB profile was not affected ($P=0.23$ to 0.65) by either F:C ratio or FOR. The results indicate that SAB are more markedly affected by dietary characteristics than LAB, and that type of forage had greater influence in bacterial communities than forage to concentrate ratio.

The aim of the second study was to assess the postprandial changes of fiber-degrading ruminal microbes and fibrolytic activity in the solid-phase of the rumen of sheep fed two high-forage diets. Four ruminally cannulated sheep were used in a cross-over design. The experimental diets contained 30% of concentrate and 70% of either alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as FOR. Sheep were fed the diets twice daily at 52 g of DM/kg body weight^{0.75}, and samples from solid rumen digesta were taken at 0, 4 and 8 h after the morning feeding. Absolute concentrations of bacterial and protozoal DNA were determined by quantitative PCR (qPCR) and DNA concentrations of fungi, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* and *Ruminococcus albus* were determined as relative abundance to total bacterial DNA. Carboxymethylcellulase, xylanase, Avicelase and amylase enzymatic activities were also determined in the solid phase of the digesta. Overall, the postprandial changes of DNA concentrations of all determined microbial populations were similar for the two diets. Concentrations of total bacterial DNA were lower ($P<0.05$) in samples taken at 4 h post-feeding compared with those taken at 0 and 8 h post-feeding, whereas protozoal DNA concentrations and relative abundance of fungal, *F. succinogenes*, *R.*

flavefaciens and *R. albus* DNA were higher ($P < 0.05$) at 4 h post-feeding. Bacterial diversity, assessed by ARISA was lower ($P < 0.05$) at 4 h post-feeding than at 0 and 8 h. In general, ruminal pH and carboxymethylcellulase, Avicelase and xylanase activities were lower ($P < 0.05$) at 4 and 8 h post-feeding compared with values determined immediately before feeding, but amylase activity remained unchanged ($P > 0.05$) over the feeding cycle. Forage type did not affect ($P = 0.40$ to 0.68) either concentrations of bacterial and protozoal DNA determined by real time PCR or the relative abundance of the two *Ruminococcus* DNA to total bacterial DNA. In contrast, sheep fed GR diet had greater relative abundance of *F. succinogenes* ($P < 0.001$) and fungal ($P = 0.02$) DNA compared with AL-fed sheep. *F. succinogenes* was the most abundant ($P < 0.05$) of the three cellulolytic species for both diets, with no differences in the abundance of the two *Ruminococcus* species ($P = 0.27$ and 0.63 for AL and GR diets, respectively). Rumen pH and CMCCase, Avicelase and amylase activities were not affected ($P = 0.15$ to 0.69) by type of forage in the diet, but xylanase activity was greater ($P = 0.01$) for GR compared with AL diet. No correlations ($P = 0.14$ to 0.97) were found between any enzymatic activities and DNA concentrations of protozoa, fungi and the three cellulolytic bacteria. In contrast, concentrations of total bacteria DNA were positively correlated ($P = 0.04$ to 0.004) with Avicelase, xylanase and amylase activities. In general, the postprandial changes of measured parameters were similar for both diets, but the influence of forage type on the structure of rumen bacterial communities in solid digesta was more evident in the first hours after feeding than at longer post-feeding periods. This highlights the influence of sampling time when investigating dietary effects on ruminal microbial populations and on rumen function.

The aim of the third study was to assess the changes in rumen fluid microbial populations during the feeding cycle in sheep as affected by the type of forage in the diet. The experimental diets, sheep, samplings and determinations were those described in the second study. Additionally, fermentation parameters and the relative abundance of methanogenic archaea to total bacterial DNA were determined. Ruminal pH, lactate concentrations and xylanase activity in ruminal fluid were not affected ($P = 0.42$ to 0.69) by FOR, but $\text{NH}_3\text{-N}$ and total volatile fatty acid concentrations, and carboxymethylcellulase and amylase activities were greater ($P < 0.001$ to 0.04) for AL compared with GR diet. Ruminal pH and carboxymethylcellulase and xylanase activities decreased ($P < 0.05$) after feeding, but amylase activity remained unchanged ($P = 0.82$) over the feeding

cycle. Total protozoa numbers in liquid phase of rumen digesta as determined by microscopic counting were higher ($P=0.02$) in AL-fed sheep than in sheep fed the GR diet, but concentrations of protozoal DNA determined by qPCR tended ($P=0.06$) to be higher in GR-fed sheep. There was no correlation ($P=0.58$; $n=24$) between protozoal numbers and total protozoal DNA concentrations. Forage type did not affect ($P=0.14$ to 0.89) either the concentration of bacterial DNA or the relative abundance of *R. albus* and methanogenic archaea to bacteria. Sheep fed AL had lower ($P<0.001$ to 0.04) abundance of *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and fungi than did GR-fed sheep. In general, postprandial changes of DNA concentrations of all determined microbial populations in the liquid phase of rumen digesta were similar for the two diets. Total bacterial and protozoal DNA concentrations decreased ($P<0.05$) at 4 h post-feeding but recovered before-feeding values at 8 h post-feeding. Bacterial diversity was assessed by ARISA. Both the number of peaks and Shannon index were greater ($P=0.02$ and 0.03) for AL compared with GR diet. For both diets, the number of peaks was lower ($P<0.05$) at 4 h post-feeding compared with before feeding. No correlations ($P>0.05$) were found between carboxymethylcellulase and xylanase activities and either the concentration of total bacterial DNA or the relative abundance of the three cellulolytic bacteria. In contrast, xylanase activity was positively correlated ($P<0.05$) with protozoa numbers, protozoal DNA concentration and methanogenic archaea. In general, there were small effects of forage on DNA concentrations of the determined microbial populations in ruminal fluid, as well as on ruminal fibrolytic activity, and the postprandial evolution of all measured parameters were similar for both diets.

The objective of the fourth study was to evaluate two fingerprinting methods, commonly used to investigate bacterial diversity. The techniques used were ARISA and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The experimental diets, sheep and sampling times have been already described. With ARISA, mean values of total number of peaks ranged from 20.0 to 50.8 for solid and from 38.5 to 52.0 for liquid samples. With DGGE, mean values of total number of peaks ranged from 9.0 to 12.8 for solid and from 8.8 to 14.3 for liquid phase of the digesta. When all samples were considered together, Shannon index ranged between 2.99 and 3.95 with ARISA, and between 2.11 and 2.61 with DGGE. Whereas no variations ($P>0.05$) in bacterial diversity over the postprandial period were detected either in solid or liquid samples with DGGE, ARISA showed a decrease ($P<0.05$) in the number of peaks in

solid samples at 4 h post-feeding compared with 0 and 8 h samplings. In liquid samples, the number of peaks was lower ($P<0.05$) at 4 h post-feeding than that before feeding in GR-fed sheep, but no differences ($P=0.14$) were observed for AL diet. Both for solid and liquid samples, AL-fed sheep showed higher ($P<0.05$) number of peaks and Shannon index values than GR-fed sheep with both ARISA and DGGE. Despite of the lower number of bands detected by DGGE, it showed a clear discrimination among solid and liquid samples when dendrograms were constructed individually for each sheep. On the whole, ARISA was shown to be easier and less time-consuming than DGGE, and therefore more appropriate for the rapid analysis of a large number of samples. DGGE can detect major shifts in bacterial populations, but it might be not sensible enough to detect subtler changes in rumen bacterial communities.

Finally, the results from the two previous studies were used to estimate the proportional contribution of solid and liquid phase of the rumen digesta to total bacterial DNA and fibrolytic activities in the rumen. Proportion of bacteria in the solid digesta ranged from 82.6% to 91.3% of total bacteria, and for both forages was higher ($P<0.05$) at 4 h compared with that at 0 and 8 h post-feeding. These results confirm that solid-associated bacteria represent the major proportion of ruminal bacteria in ruminants fed forage diets, and indicate that forage type has no influence on their relative proportion. All measured enzymatic activities were higher ($P<0,001$) in SOL compared with LIQ. Xylanase activity in solid phase contributed to over 75% of total xylanase activity in the rumen. Amylase and carboxymethylcellulase in the solid contributed to over 64 and 46%, respectively. These results indicate that in sheep fed high-forage diets, a high proportion of fibrolytic activity is associated with rumen solid digesta.