



Universitat Autònoma de Barcelona

**ESTUDIO DE LA ACIDOSIS RUMINAL
Y NUEVAS ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN**

MEMÒRIA PRESENTADA PER MARTA BLANCH SABORIT

PER ACCEDIR AL GRAU DE DOCTOR DINS EL PROGRAMA DE DOCTORAT
DE PRODUCCIÓ ANIMAL DE LA UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE
BARCELONA DEL DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS

Bellaterra, 2009



FACULTAT DE VETERINÀRIA DE BARCELONA

Sergio Calsamiglia Blancafort, Professor Titular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, i **Àlex Bach Ariza**, Director de la Unitat de Remugants de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries

Certifiquen:

Que la memòria titulada “**Estudio de la acidosis ruminal y nuevas estrategias de prevención**” presentada per la Llic. **Marta Blanch Saborit** es va realitzar sota la seva direcció i, considerant que compleix amb les condicions exigides per optar al grau de Doctor en el Programa de Producció Animal que concedeix la Universitat Autònoma de Barcelona, autoritzen la seva dissertació pública per a que sigui jutjada per la comissió corresponent.

I per tal que consti els efectes que corresponen, signen la present a Bellaterra, gener del 2009.

Dr. Sergio Calsamiglia Blancafort

Dr. Àlex Bach Ariza

“If”... (Si...)

Si pots dur el cap ben posat sobre les espatlles
Quan altres el perden i a més te'n culpen;
Si pots confiar en tu quan tots de tu dubten,
Però tenir compte de llurs dubtes;
Si pots esperar sense que et cansi l'espera,
O suportar calúmnies sense pagar en la mateixa moneda,
O ésser odiat sens donar cabuda a l'odi,
I no per això semblar massa bo o massa savi;

Si pots somiar sense que els teus somnis et dominin;
Si pots pensar sense que els pensaments siguin la teva meta,
Si te les pots veure amb el Triomf i el Desastre
I tractar per igual aqueixos dos farsants;
Si pots tolerar que els brètols
Tergiversin la veritat que has expressat,
I la converteixin en trampa per a babaus,
O veure enrunada l'obra de la teva vida
I ajupir-te i reconstruir-la amb velles eines;

Si pots fer un lligat amb tots els teus guanys
I llençar-los al caprici de l'atzar,
I perdre'ls, i tornar a començar des de zero
Sense que surti ni una queixa dels teus llavis;
Si pots posar al servei dels teus fins
cor, entusiasme i fortalesa, fins i tot exhaurits,
I resistir encara que no et quedi res,
tret de la Voluntat, que els digui: "Endavant!";

Si pots dirigir-te a les multituds sense perdre la teva virtut,
I alternar amb reis sense perdre la senzillesa;
Si no poden ferir-te amics ni enemics;
Si tots compten amb tu, però no massa;
Si pots omplir l'implacable minut
Amb seixanta segons d'esforç agosarat,
Teva és la Terra i tot allò que hi ha,
I, més encara: seràs home, fill meu.

Rudyard Kipling
Al seu fill John, 1910

(Traducció: Josep M. Albaigès, 1997)

***Perquè sense la perseverància aquest dia no hagués estat possible, com també sense
l'ajuda de molts altres...***

Primer de tot, agrair a en Sergi la oportunitat de treballar amb ell i “d’enganyar-me” (en el bon sentit) per embarcar-me en el tema de la tesi, gràcies per tot el que he pogut aprendre...

Gràcies Àlex, per fer-me pensar dos cops el que escrivia, m’ha donat més seguretat, encara que, perquè no dir-ho, al principi em feies una mica la punyeta...

Agrair a l’Alfred per ser com el papa del grup, per la seva amabilitat i, sobretot, per rebre a estudiants de fora...

També agrair a la resta de professors, secretàries i personal, per fer de la feina un ambient agradable. Sobretot als companys de laboratori: a la Rosa, a en Blas i a la meravella de la Carme...

Agrair al grup de Genètica, especialment a l’Òscar per introduir-me en el món de la recerca, i també a l’Anna per la paciència que va tenir amb mi...

Gràcies a tots aquells amb els qui hem compartit el dia a dia...Als companys que em van rebre quan vaig arribar: Marta, Lorena, Paul, Montse, Sílvia, Estela, Ana, Bego..., i també als que ja hi eren però que van anar uns dos mesos tard, amb els que vam riure molt: Toni, Amine... Als que es van anar incorporant: Mari Carmen, Marthali, Diego, Roser, María C, Cristina, Feliu, Sara, Andreas, María R... Als companys que ja han tornat a casa o que els que estant voltant pel món: Glauber, Luciano, Aina, Nacho... Als companys que van marxar massa aviat... David, Santiago... Als companys de la peixera... Als companys de Nutrició... Als que ens han passat a visitar: Cristina, Marta, Jaap, Daniel, Mohsen... Això de tenir tants companys a recordar, em sembla que vol dir que ja començo ser massa veterana per estar aquí! Disculpeu-me si m’he oblidat de mencionar a algú, però és que ja comença a fallar la memòria... Però el millor és que m’enduc molts bons records i molts bons amics!

Gràcies Fausto, Ana i Elena, per ajudar-me a la granja. I també Cristina, Maria i Marta, per ajudar-me en els mostres de Monells...

Agrair la bona acollida rebuda al Rowett: John, Tony, Nest, Tracy, Katie, Silvia, Susan i, molt especialment, a Stefan... I sobretot a en Kevin i a la Gayanne per les llargues xerrades dels vespres, per fer del número 4 de Walton Road la nostra casa a Escòcia...

Per a les amigues de sempre i per sempre: Marta, Sara, Maria i Helena

Pels amics i amigues de la facultat, especialment a la Meri, la Júlia, l’Anna, la Núria, l’Aida, en Guillem, la Maribel i la Gemma

I molt especialment, dedico aquest treball als qui més estimo: als pares, a la Montse, a la Mita i a en Vinz... Sou de ben segur, els que m’heu aguantat més la tavarra, i heu estat amb mi ens els bons i mals moments, gràcies per poder confiar sempre en vosaltres... I també vull fer un petonet molt fort a la nina de la casa...

La realització dels estudis de tercer cicle que culminen amb la presentació de la següent tesi doctoral ha estat possible gràcies a una **beca FPU del Ministerio de Educación y Ciencia** pel període 2005-2008.

RESUMEN

Esta tesis doctoral se planteó con el fin de profundizar en el estudio de la acidosis ruminal, al ser el trastorno digestivo más común en ganado vacuno, causando cada año pérdidas millonarias en el sector ganadero. Este proceso deriva del incremento en la proporción de carbohidratos rápidamente fermentables en la dieta, y que se traduce en una acumulación excesiva de ácidos grasos volátiles (**AGV**) y lactato en el rumen llevando a una disminución del pH ruminal. Las bacterias productoras (*Streptococcus bovis*) y utilizadoras (*Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium*) de lactato juegan un papel importante en el desarrollo de la acidosis. Partiendo de estos conocimientos, se pensó que el desarrollo de técnicas para detectar y cuantificar estas bacterias podría ser una herramienta de gran utilidad para el estudio de la acidosis ruminal. Para ello en el experimento 1 se desarrollaron dos sondas para **PCR** (reacción en cadena de la polimerasa) a tiempo real para detectar y cuantificar *S. bovis* y *M. elsdenii*. Se utilizaron muestras de 4 vacas y 4 terneras para comprobar la especificidad y variabilidad de la técnica. La técnica se desarrolló con unas eficiencias del 88% y 99% para *S. bovis* y *M. elsdenii*, respectivamente. Asimismo, la variabilidad de la técnica fue diferente dependiendo del factor a considerar: día, hora o animal de muestreo, con coeficientes de variación altos y siempre superiores en terneras que en vacas. Posteriormente se empleó esta técnica en los experimentos siguientes, permitiendo progresar en comprender el rol que tienen estas bacterias en el proceso de la acidosis.

El experimento 2 se realizó con el objetivo de determinar los efectos de administrar altos niveles de carbohidratos no fibrosos (**CNF**) en la dieta sobre la fermentación ruminal y el metabolismo de vacas lecheras. Para ello se utilizaron 62 vacas Holstein (peso vivo = 654 ± 14 kg, días en lactación = $186 \pm 6,8$, 40 multíparas y 22 primíparas), 8 de ellas provistas de una cánula ruminal (5 multíparas y 3 primíparas), en un diseño *cross-over* de dos periodos de 30 d cada uno. Los tratamientos fueron: una dieta tradicional (**TR**) y una dieta alta en CNF (**HC**). La ingestión de materia seca (**IMS**) y la producción de leche se registraron diariamente. Las muestras para determinar la composición de leche y las muestras de sangre se tomaron cada 15 d. La incidencia de laminitis y diarrea fue evaluada 1 vez por semana. Las muestras de heces fueron tomadas una vez por periodo dentro de la primera hora post-ingestión. Las muestras de líquido ruminal se tomaron a las 0h, 4h y 8h post-alimentación los últimos 3 d de cada

periodo. El pH ruminal se registró cada 22 min durante los últimos 6 d de cada periodo. Se observó que la producción de leche y el contenido de proteína en leche fueron mayores, y el contenido de grasa en leche y la IMS de concentrado durante el ordeño fueron menores en el grupo HC comparado con el TR, respectivamente. Las concentraciones de glucosa e insulina en sangre fueron menores en el grupo TR comparado con el grupo HC, y el grupo HC presentó una menor digestibilidad del almidón en el tracto total. Las vacas HC permanecieron más horas a pH ruminal < 5,6 comparado con las vacas TR, y el pH ruminal medio del grupo HC fue menor comparado con el grupo TR. Los animales que recibieron la dieta HC tuvieron 4 veces mayor riesgo de padecer laminitis que los animales que recibieron la dieta TR y, aunque no se observaron diferencias entre tratamientos en la incidencia de diarrea. Estos resultados indican que alimentar vacas lecheras con dietas altas en CNF durante periodos cortos de tiempo puede incrementar la producción de leche, aunque puede provocar algunos efectos negativos sobre la salud de los animales.

Finalmente, en los experimentos 3 y 4, se evaluaron los efectos de dos nuevas alternativas contra la acidosis ruminal: una en terneras de engorde (experimento 3) y otra en vacas lecheras (experimento 4).

El experimento 3 consistió en describir los cambios fisiológicos durante la inducción a la acidosis y su control mediante una preparación comercial de anticuerpos policlonales (mayoritariamente contra *S. bovis*) sobre la fermentación ruminal en terneras en una inducción a la acidosis. Se utilizaron 12 terneras cruzadas provistas de un trocar ruminal (peso vivo= 452 ± 20 kg), y se distribuyeron completamente al azar en 2 grupos de 6 animales cada uno: el grupo control (**CTR**) y el grupo que recibía el tratamiento de anticuerpos (**PAP**). El protocolo de inducción a la acidosis incluía 3 periodos: 3 meses de alimentación forrajera (100% festuca *ad libitum*), 10 d de adaptación al tratamiento (días 1-10 del experimento, 100% festuca *ad limitum* + 10 mL de PAP en la comida en el grupo tratamiento) y 5 d de cambio de dieta a concentrado (días 11-15 del experimento). El cambio de alimentación consistió en incrementar la ingesta de concentrado 2,5 kg de MS por día hasta alcanzar 12,5 kg, festuca *ad limitum* y 10 mL de PAP en el grupo tratamiento. El nivel de concentrado de 12,5 kg/d se mantuvo hasta que las terneras entraran en acidosis (días 16-22 del experimento). La acidosis se declaró cuando el pH era inferior a 5,5 o cuando la ingesta de concentrado se reducía

más del 50% respecto al día anterior. Cuando un animal era declarado acidótico se le administraba una dieta 50:50 forraje:concentrado, se monitoreaba durante 4 d y se retiraba del experimento. Los animales que no entraron en acidosis 12 d después del inicio de la transición (día 22 del experimento) se consideraron resistentes a la acidosis. Las muestras de líquido ruminal se tomaron a las 0h y 6h post-alimentación. Solamente las muestras recogidas durante los días 1 y 10 de adaptación, 3 y 1 d antes de la acidosis, el día de la acidosis, y 1 y 4 d después de la acidosis fueron analizadas. El 83,3% y el 50,0% de los animales entraron en acidosis en el grupo CTR y PAP, respectivamente, y tardaron de media $5,25 \pm 0,17$ d después del inicio del cambio de dieta. Asimismo, el perfil de fermentación de los animales acidóticos fue similar entre tratamientos. El grupo PAP tuvo mayores valores de pH a las 0h post-alimentación en los días 16, 18 y 19 de experimento comparado con el grupo CTR. Estos resultados indican que PAP puede ser efectivo para controlar la acidosis en terneras durante una transición rápida a concentrado.

El objetivo del experimento 4 fue evaluar los efectos de un inhibidor de la actividad α -amilasa (acarbose) en el control de la acidosis ruminal sobre la fermentación ruminal y el metabolismo en vacas lecheras. Se usaron 8 vacas Holstein (peso vivo = 622 ± 54 kg, días en lactación = 183 ± 67 , 5 multíparas y 3 primíparas) provistas de una cánula ruminal en un diseño *cross-over* 2x2. Los tratamientos fueron: control (sin aditivo, **CTR**) y acarbose (0,75 g/animal/d, **AMI**). Los animales recibieron una dieta de alta producción totalmente mezclada y concentrado durante el ordeño. La IMS fue registrada diariamente. La incidencia de laminitis y diarrea fue evaluada 1 vez por semana. Las muestras de sangre se tomaron cada 15 d. Las muestras de líquido ruminal se tomaron a las 0h, 4h y 8h post-alimentación los últimos 3 d de cada periodo. El pH ruminal se registró cada 22 min durante los últimos 6 d de cada periodo. Se observó que el grupo AMI estuvo menos horas a $\text{pH} < 5,6$ y tuvo un pH ruminal medio superior comparado con el grupo CTR. Microbiológicamente, los animales AMI tendieron a tener una menor ratio *S. bovis*:*M. elsdenii* comparado con los CTR. No se observaron diferencias en el resto de parámetros. Estos resultados indican que el suplemento de dietas con acarbose en vacas lecheras alimentadas con raciones de alta producción puede ser efectivo en reducir la acidosis ruminal sin repercusiones en la fermentación ruminal del animal ni en su metabolismo.

SUMMARY

This doctoral thesis was designed to increase our knowledge of acidosis, because it is the most common nutritional disorder in cattle, and it has a great economic impact. This process is the result of the increase in the proportion of non-fiber carbohydrates (NFC) in the diet, that it is translated into an excessive accumulation of volatile fatty acids (VFA) and lactate in the rumen causing a decrease in ruminal pH. Lactic acid-producing (*Streptococcus bovis*) and lactic acid-utilizing (*Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium*) bacteria have a key role in the development of acidosis. As a result, the development of techniques to detect and quantify these bacteria could be an interesting tool to study ruminal acidosis. For this purpose, in experiment 1 two real-time PCR (polymerase chain reaction) probes were developed to detect and quantify *S. bovis* and *M. elsdenii*. Samples of 4 dairy cows and 4 feedlot heifers were used to test the specificity and variability of the technique. The two PCR probes had efficiencies of 88% and 99% for *S. bovis* and *M. elsdenii*, respectively. The variability of the technique was different depending on the factor: day, hour or animal sampled, and the coefficients of variation were large and always higher in heifers than in cows. In the following experiments of this thesis, these techniques were used to progress in the understanding of the role that these bacteria have in the development of acidosis.

The second experiment was designed to study the effects of administrating high levels of NFC in the diet on ruminal fermentation and animal metabolism of lactating dairy cows. Sixty-two lactating Holstein cows (BW = 654 ± 14 kg, DIM = 186 ± 6.8, 40 multiparous and 22 primiparous), 8 of them fitted with rumen cannulas (5 multiparous and 3 primiparous) were used to study the effects of two dietary NFC levels on ruminal fermentation and animal metabolism following a cross-over design with 2 periods of 30 d each. Treatments were: a traditional ration (TR) and a high-NFC ration (HC). Milk yield and feed intake were recorded daily and milk composition biweekly. The incidence of lameness and diarrhea was scored once a week. Animals were blood sampled to determine blood glucose, insulin, and urea concentrations within the first hour after the morning feeding in 2 separate days in each treatment. Faecal samples were taken 1 d in each treatment within the first hour after the morning feeding. Samples of ruminal contents were collected during 3 d in each treatment at 0, 4 and 8 h post-feeding. Rumen pH was recorded electronically at 22-min intervals during 6 d in

each treatment. Milk yield and milk protein content were greater, milk fat content and concentrate intake at the milking unit were lesser in HC compared with TR, respectively. Blood glucose and insulin concentrations were lesser in TR compared with HC, and HC resulted in a lesser total tract starch digestibility. Rumen pH of HC cows fell below 5.6 for longer periods of time than that of TR, and mean pH of HC was lower compared with TR. Animals who received HC diet had four times more risk of lameness than TR group; however, no effects of treatment were observed on the incidence of diarrhea. These results indicate that feeding high NFC diets to dairy cows for short periods of time may increase milk yield, but this would incur in negative effects on animal health.

Finally, in the third and in the fourth experiments two new strategies against acidosis were tested: one in feedlot heifers (experiment 3) and another in dairy cows (experiment 4).

In the third study, physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation (**PAP**) in heifers were studied. A completely randomized experiment was designed using 12 crossbred heifers (452 ± 20 kg BW). Treatments were control (**CTR**) and PAP. The acidosis induction protocol had 3 periods: 3 mo of 100% fescue hay feeding ad libitum, 10 d (from day 1 to 10 of the experiment) of adaptation to the treatment (100% forage feeding + 10 mL/d of PAP top-dressed to the treatment group) and 5 d (from day 11 to 15 of the experiment) of transition that consisted of increasing 2.5 kg of concentrate per day up to 12.5 kg, fescue ad libitum and 10 mL of PAP in the treatment group. Concentrate feeding level at 12.5 kg per day was maintained until heifers developed acidosis (from day 16 to 22 of the experiment). Acidosis was declared when rumen pH reached 5.5 and(or) when concentrate intake decreased more than 50% compared with the previous day. When an animal was considered acidotic it was changed to a 50:50 forage:concentrate diet, monitored for 4 d and taken out of the experiment. Animals not declared in acidosis 12 d after the start of the transition (day 22 of the experiment) were considered acidosis-resistant. Samples of ruminal fluid were collected at 0 and 6 h post feeding. Only samples collected during adaptation to the treatment, 3 and 1 d prior to acidosis, acidosis day, and 1 and 4 d after acidosis day were analyzed. After the feeding challenge, acidosis was declared 5.25 ± 0.17 d after the start of transition, during which

83.3 and 50.0% of the animals entered in acidosis in CTR and PAP groups, respectively. However, the fermentation profile of animals with acidosis was similar between treatments. Heifers fed PAP had greater pH before feeding on days 16, 18 and 19 of the experiment compared with CTR. These results indicate that PAP may be effective in controlling acidosis of heifers during a rapid transition to a high-concentrate diet.

The objective of experiment 4 was to evaluate the effects of an amylase inhibitor (acarbose) in dairy cows to control ruminal acidosis in a 2x2 cross-over design. Eight Holstein cows fitted with a rumen cannula (BW = 622 ± 54 kg, DIM = 183 ± 67, 5 multiparous and 3 primiparous) were used to study animal metabolism and ruminal fermentation. Treatments were: control (no additive, **CTR**) and acarbose (0.75 g/cow/d, **AMI**). Animals were fed with a high-NFC partial mixed ration and concentrate during milking. Animals were blood sampled to determine blood glucose, insulin, and urea within the first hour after the morning feeding in 2 separate days in each period. Samples of ruminal contents were collected during 3 d in each period at 0h, 4h and 8h post feeding. Rumen pH was recorded electronically at 22-min intervals during 6 d in each period. AMI group stayed less hours below pH = 5.6 and had greater daily average pH compared with CTR group. AMI animals tended to have lower *S. bovis* to *M. elsdenii* ratio than CTR. These results indicate that supplementing diets with acarbose to dairy cattle fed high-NFC rations may be effective in reducing acidosis in lactating cows with no negative effects on ruminal fermentation and animal metabolism.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
LISTA ABREVIACIONES	1
CAPÍTULO 1. Revisión bibliográfica.....	3
1. Introducción y planteamiento del problema.....	5
2. Definición de la acidosis ruminal.....	8
3. Etiología de la acidosis ruminal.....	8
3.1. Introducción.....	8
3.2. Papel de <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Megasphaera elsdenii</i> y <i>Selenomonas</i> <i>ruminantium</i> en el desarrollo de la acidosis láctica.....	14
4. Tipos de acidosis ruminal	16
4.1. Acidosis ruminal aguda.....	16
4.2. Acidosis ruminal subclínica.....	17
5. Prevención y control de la acidosis ruminal.....	17
5.1. Introducción.....	17
5.2. Aditivos para la prevención de la acidosis ruminal.....	23
5.2.1. Sustancias tampón.....	23
5.2.2. Ionóforos.....	26
5.2.3. Alcalinizantes.....	31
5.2.4. Ácidos orgánicos.....	32
5.2.5. Plantas y extractos de plantas.....	35
5.2.6. Prebióticos y probióticos	38
5.2.6.1. Levaduras.....	39
5.2.6.2. Hongos.....	42
5.2.6.3. Bacterias utilizadoras de lactato.....	43
5.2.6.4. Bacterias productoras de lactato.....	45
5.2.7. Inmunización.....	46
6. Conclusiones.....	53
7. Objetivos.....	54

	Pág.
CAPÍTULO 2. Experimento 1:	
Quantification of <i>Streptococcus bovis</i> and <i>Megasphaera elsdenii</i> in ruminal fluid of cows and heifers by real time PCR technique	55
ABSTRACT.....	57
1. Introduction	57
2. Materials and methods	58
3. Results and discussion	63
4. Implications	69
 CAPÍTULO 3. Experimento 2:	
Effects of two dietary non-fiber carbohydrate levels on ruminal fermentation and animal metabolism of lactating cows	79
ABSTRACT.....	81
1. Introduction	82
2. Materials and methods	83
3. Results and discussion	86
4. Conclusions	90
 CAPÍTULO 4. Experimento 3:	
Physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation in heifers	95
ABSTRACT.....	97
1. Introduction	98
2. Materials and methods	98
3. Results and discussion	102
4. Conclusions	106
 CAPÍTULO 5. Experimento 4:	
Effects of an amylase inhibitor (acarbose) on ruminal fermentation and animal metabolism in lactating cows fed with a high-carbohydrate ration	119
ABSTRACT.....	121
1. Introduction	121
2. Materials and methods	122

	Pág.
3. Results and discussion	125
4. Conclusions	126
CAPÍTULO 6. Discusión general	133
1. Introducción.....	135
2. Justificación del trabajo.....	135
3. Parámetros ruminales que afectan el pH ruminal medio.....	137
4. Parámetros ruminales que afectan a la concentración de ácido láctico.....	143
5. Nuevas estrategias de prevención de la acidosis ruminal.....	145
6. Reflexiones.....	146
4.1. Inducir acidosis ruminal en condiciones experimentales.....	146
4.1. Registro del pH ruminal.....	147
CAPÍTULO 7. Conclusiones	149
CAPÍTULO 8. Anexos.....	153
Anexo 1. Métodos de estudio de la microflora ruminal	155
Anexo 2. Procedimientos Normalizados de Trabajo	173
2.1. Extracción de DNA de líquido ruminal	175
2.2. PCR a tiempo real.....	181
CAPÍTULO 9. Referencias bibliográficas	189

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág.
CAPÍTULO 1. Revisión bibliográfica	
Índice de Tablas	
Tabla 1. Estudios referentes a la incidencia de acidosis ruminal	8
Tabla 2. Comparación de la dieta y del pH ruminal entre terneros de engorde y vacas en lactación	9
Tabla 3. Factores que influyen en la producción de saliva	10
Tabla 4. Predicción de la producción diaria de ácidos producidos de la fermentación y capacidad tampón de la saliva en 4 dietas distintas	11
Tabla 5. Factores susceptibles de ser modificados con el fin de reducir la incidencia de acidosis clínica o subclínica	19
Tabla 6. Efecto del aumento de los carbohidratos no fibrosos en la ración de vacas lecheras sobre la ingestión, la producción y la composición de leche, la digestibilidad del almidón y el pH ruminal	20
Tabla 7. Efecto sobre el pH de la inclusión de bicarbonato de sodio versus el control en varios estudios	24
Tabla 8. Efecto de la adición de bicarbonato de sodio sobre el pH	26
Tabla 9. Efectos de la administración de monensina sobre el pH, lactato, conteo de colonias de <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> y bacterias utilizadoras de lactato en líquido ruminal de vacuno inducido a acidosis láctica	30
Tabla 10. Efecto del DL-malato sobre el pH ruminal y productos finales de fermentación en terneros alimentados con una dieta alta en concentrado	34
Tabla 11. Efecto del cambio de dieta forrajera a concentrada sobre el pH y la concentración de lactato en carneros no inmunizados contra <i>Streptococcus bovis</i> , inmunizados con bacteria viva y adyuvante, bacteria muerta con adyuvante y bacteria muerta sin adyuvante	48
Tabla 12. Efecto de la administración de varias dosis de una preparación de anticuerpos policlonales contra <i>Streptococcus bovis</i> sobre los recuentos de <i>S. bovis</i> y <i>Fusobacterium necrophorum</i> en terneros alimentados con dietas altas en concentrado	51

	Pág.
Índice de Figuras	
Figura 1. Evolución de la cabaña de vacas lecheras y del rendimiento medio por vaca en Estados Unidos, Israel, Unión Europea y España entre 1980 y 2006	6
Figura 2. Frecuencia del pH ruminal observado en el total de vacas examinadas ...	7
Figura 3. Relación entre pH y concentración de ácidos grasos volátiles en el rumen	13
Figura 4. Eventos asociados con la aparición de la acidosis aguda	13
Figura 5. Principales bacterias involucradas en la producción y la utilización del lactato	15
Figura 6. Concentraciones de ácido láctico y pH después de 12 h de fermentación <i>in vitro</i> de varias materias primas	20
Figura 7. Efecto de la frecuencia de alimentación sobre el pH ruminal: 2 veces al día y 12 veces al día	21
Figura 8. Interacción del contenido de fibra ácido detergente en la dieta y de la ingestión de bicarbonato sódico sobre el contenido de grasa en la leche	24
Figura 9. Esquema del mecanismo de acción de la monensina sobre las bacterias gram-positivas ruminales	27
Figura 10. Morfología de la pared celular de bacterias gram-positivas y gram-negativas	29
Figura 11. Efecto de distintos tipos de tampones y alcalinizantes sobre el pH en líquido ruminal durante 48 h de incubación	31
Figura 12. Esquema de la formación y metabolismo de los ácidos orgánicos en el rumen	32
Figura 13. Efectos de la adición de malato sobre el pH y el L-Lactato en condiciones ruminales <i>in vitro</i>	33
Figura 14. Efecto de los taninos condensados sobre el timpanismo en terneros que reciben trigo en pastura durante distintos estadios de crecimiento	36
Figura 15. Influencia del extracto de <i>Yucca shidigera</i> en el crecimiento de <i>Streptococcus bovis</i> en cultivo puro	38
Figura 16. Utilización del lactato por parte de <i>Selenomonas ruminantium</i> , comparando cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con levaduras vivas y muertas..	40

	Pág.
Figura 17. Esquema de los efectos de las levaduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) en el medio ruminal	41
Figura 18. Efectos de la administración de extractos de fermentación de <i>Aspergillus oryzae</i> en terneras en crecimiento sobre la producción total de ácidos grasos volátiles	42
Figura 19. Efecto de <i>Aspergillus oryzae</i> sobre la utilización de lactato por parte de <i>Megasphaera elsdenii</i>	43
Figura 20. Efecto de la inoculación de <i>Megasphaera elsdenii</i> en cultivos ruminales sobre el pH, el D-lactato y el L-lactato	44
Figura 21. Densidad ruminal de <i>Megasphaera elsdenii</i>	45
Figura 22. Concentraciones de anticuerpos contra <i>Streptococcus bovis</i> y <i>Lactobacillus</i> en suero y saliva de terneros inmunizados contra estas bacterias y en animales control	47
Figura 23. Concentración de lactato 24 h después del cambio de dieta forrajera a concentrada en animales vacunados contra <i>Streptococcus bovis</i> y <i>Lactobacillus</i> y en animales control	48
Figura 24. Efecto del cambio de dieta forrajera a concentrada sobre el índice de diarreas en carneros no inmunizados contra <i>Streptococcus bovis</i> , inmunizados con vacuna con bacteria viva y adyuvante, bacteria muerta con adyuvante, bacteria muerta sin adyuvante	49
Figura 25. Efecto de la vía de administración de una vacuna contra <i>Streptococcus bovis</i> sobre la ingestión diaria y el pH ruminal en carneros	50

CAPÍTULO 2. Experimento 1

Índice de Tablas

Table 1. Specificity of the primer-probe combinations	70
Table 2. Effect of the type of animal (heifers vs cows) on pH, ammonia N and volatile fatty acids	71
Table 3. Effect of the type of animal (heifers vs cows) on quantification of <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Megasphaera elsdenii</i> and their ratio	73
Table 4. Coefficients of variation of real-time PCR of <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Megasphaera elsdenii</i> , and their ratio	74

	Pág.
Table 5. Coefficients of variation of the determination of total VFA, acetic acid and ammonia N	75

Índice de Figuras

Figure 1. Standard curves of <i>Streptococcus bovis</i> (a) and <i>Megasphaera elsdenii</i> (b) from pure cultures	76
Figure 2. Serial dilutions of ruminal fluid DNA with <i>Streptococcus bovis</i> (a) and <i>Megasphaera elsdenii</i> (b) primers	77

CAPÍTULO 3. Experimento 2

Índice de Tablas

Table 1. Ingredient and nutrient composition of the experimental diets	91
Table 2. Primers, Taqman probes-MGB, and PCR conditions used in this study ...	92
Table 3. Effect of non-fiber carbohydrate level of the ration on feed intake, and on milk yield and composition	93
Table 4. Effect of non-fiber carbohydrate level of the ration on ruminal parameters	94

CAPÍTULO 4. Experimento 3

Índice de Tablas

Table 1. Primers, probes and PCR conditions used in this study	107
Table 2. Effects around onset of acidosis and treatment with a multivalent polyclonal antibody preparation on voluntary feed intake in crossbred heifers	108
Table 3. Effects around onset of acidosis, hours post-feeding and treatment with a multivalent polyclonal antibody preparation on ruminal pH and lactate in crossbred heifers	109
Table 4. Effects around onset of acidosis, hours post-feeding and treatment with a multivalent polyclonal antibody preparation on VFA in crossbred heifers	110
Table 5. Effects around onset of acidosis, hours post-feeding and treatment with a multivalent polyclonal antibody preparation on quantification of <i>Streptococcus bovis</i> and <i>Megasphaera elsdenii</i> in crossbred heifers	112
Table 6. Effects around onset of acidosis, hours post-feeding and treatment with a multivalent polyclonal antibody preparation on protozoa counts in crossbred heifers	113

	Pág.
Table 7. Effect around onset of acidosis, hours post-feeding ad treatment with a multivalent polyclonal antibody preparation on quantifications of three stirpes of <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> in crossbred heifers	114

Índice de Figuras

Figure 1. Cluster analysis results of the DGGE profiles demonstrated graphically as an UPGMA dendrogram comparing the day 10 of adaptation, acidosis day and 4 days after acidosis	116
Figure 2. Ruminal pH at 0 h post-feeding in control and multivalent polyclonal preparation group during all the experiment	117

CAPÍTULO 5. Experimento 4

Índice de Tablas

Table 1. Ingredient and nutrient composition of the experimental diet	127
Table 2. Primers, Taqman probes-MGB, and PCR conditions used in this study ...	128
Table 3. Effect of an amylase inhibitor on dry matter intake, milk yield, and blood parameters.....	129
Table 4. Effect of an amylase inhibitor on volatile fatty acids, ammonia N and ruminal pH	130
Table 5. Effect of an amylase inhibitor on microbial profile	131

Índice de Figuras

Figure 1. Ruminal pH evolution during the day in control and amylase inhibitor group	132
---	-----

CAPÍTULO 6. Discusión general

Índice de Tablas

Tabla 1. Coeficientes de determinación entre los parámetros estudiados: el pH medio, el tiempo total por debajo de 6,0 y el área bajo la curva de pH 6,0.....	138
Tabla 2. Modelos de regresión de pH ruminal medio.....	139
Tabla 3. Coeficiente de determinación parcial de las variables incluidas en los modelos de regresión	139

	Pág.
Tabla 4. Coeficientes de determinación entre pH y concentración de ácidos grasos volátiles en varios estudios	140
Tabla 5. Variables utilizadas en el análisis de regresión del lactato	143
Tabla 6. Coeficientes de determinación parciales del modelo de regresión del lactato	144

Índice de Figuras

Figura 1. Relación entre pH y concentración de lactato en líquido ruminal de terneras en dos experimentos	142
Figura 2. pH ruminal medio diario en el experimento 2 entre tratamientos utilizando el registro electrónico o manual	148
Figura 3. pH ruminal medio diario en el experimento 4 entre tratamientos utilizando el registro electrónico o manual	148

CAPÍTULO 8. Anexos

Anexo 1: Métodos de estudio de la microflora ruminal

Tabla 1. Métodos moleculares más usados para el estudio de la microflora gastrointestinal	160
Tabla 2. Fluorocromos más usados en PCR a tiempo real.....	167
Tabla 3. Estudios de microflora ruminal mediante la técnica de PCR a tiempo real.	172

Índice de Figuras

Figura 1. Fases de la reacción en cadena de la polimerasa (a), amplificación exponencial de la reacción en cadena de la polimerasa (b).....	161
Figura 2. DGGE con amplificación previa con PCR de un fragmento 16S rRNA de <i>Oscillospira</i>	163
Figura 3. Esquema de la técnica de T-RFLP	164
Figura 4. Hibridación fluorescente específica para <i>Oscillospira</i> en líquido ruminal de ganado vacuno en Illinois	166
Figura 5. Agente intercalante SYBR Green I	167
Figura 6. Sondas Taqman	168
Figura 7. Amplification plot	170

LISTA DE ABREVIACIONES

Revisión bibliográfica (Capítulo 1):

AGV = ácidos grasos volátiles

AO = ácidos orgánicos

CNF = carbohidratos no fibrosos

DA = digestibilidad del almidón

DE = desviación estándar

EE = extracto etéreo

FAD = fibra ácido detergente

FND = fibra neutro detergente

GB = grasa bruta

GMD = ganancia media diaria

IM = intramuscular

IMS = ingestión de materia seca

IP = intraperitoneal

MO = materia orgánica

MS = materia seca

ND = no determinado

NS = no significativo

PB = proteína bruta

pCO₂ = presión parcial de CO₂

PV = peso vivo

Artículos (Capítulo 2, 3, 4 y 5):

AA = aminoacids

ADF = acid detergent fiber

AMS = automatic milking system

Ann. T^a = anealing temperature

B.f. = *Butyrivibrio fibrisolvens*

BW = body weight

CP = crude protein

DGGE = denaturing gradient gel electrophoresis

DIM = days in milk

DM = dry matter

DMI = dry matter intake

DNA = deoxyribonucleic acid

dNTP = deoxynucleotide triphosphate

EE = ether extract

EU = European Union

Fw = forward

IU = international unit

MGB = minor groove binder

ND = non determined

NDF = neutral detergent fiber

NE_L = net energy lactation

NFC = non-fiber carbohydrates

NS = not significant

P = probe

PCR = polymerase chain reaction

PMR = partial mixed ration

qPCR = quantitative polymerase chain reaction

Rv = reverse

SEM = standard error of the means

VFA = volatile fatty acids

Discusión (Capítulo 6):

ACET = ácido acético

AGV = ácidos grasos volátiles

BUT = ácido butírico

CNF = carbohidratos no fibrosos

ENT = entodinomorfos

HOL = holotricos

IBUT = ácido isobutírico

IVAL = ácido isovalérico

LAC = ácido láctico

ME = *Megasphaera elsdenii*

NE = variable no estudiada

NH₃ = amoníaco

PHM = pH ruminal medio

PROP = ácido propiónico

qPCR = reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

R² = coeficiente de determinación

SB = *Streptococcus bovis*

VAL = ácido valérico

Conclusiones generales (Capítulo 7):

NFC = non-fiber carbohydrates

Anexos (Capítulo 8) :

Ct = threshold cycle

DGGE = denaturing gradient gel electrophoresis

DNA = deoxyribonucleic acid

dNTP = deoxynucleotide triphosphate

FISH = fluorescent in situ hybridization

LR = líquido ruminal

NTC = non-template control

PCR = polymerase chain reaction

PNT = procedimiento normalizado de trabajo

qPCR = quantitative polymerase chain reaction

rDNA = ribosomal deoxyribonucleic acid

RNA = ribonucleic acid

rRNA = ribosomal ribonucleic acid

SDS = sodio dodecil sulfato

TE = TRIS-EDTA buffer

TGGE = temperature gradient gel electrophoresis

T_m = temperatura de fusión

T-RFLP = Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism

UGQ = Unitat Garantia de Qualitat

UV = ultravioleta

CAPÍTULO 1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los rumiantes se alimentan principalmente a base de forrajes. Pero en las últimas décadas la producción animal en general y, por lo tanto, también la de vacuno, se ha ido intensificando. Este fenómeno se ha observado sobretodo en Norte América, Europa occidental e Israel. El ejemplo más claro lo podemos observar en las vacas lecheras. Mientras la tendencia general ha sido disminuir la cabaña lechera (Figura 1a), la producción media por vaca ha aumentado con los años, siendo las producciones más altas en Israel y Estados Unidos (medias de más de 9.000 kg/vaca/año). En España, la producción media por vaca se ha doblado en los últimos veinticinco años, pasando de 3.268 kg/vaca/año en 1980 a 6.850 kg/vaca/año en 2007, sobrepasando a partir del 2002 la media europea (Figura 1b).

Para incrementar la producción animal es necesario aumentar el aporte de energía, proteína, minerales y vitaminas. Para ello, es necesario adaptar los sistemas de alimentación, ya que el aporte exclusivo de forrajes no sería suficiente para cubrir las necesidades del animal, teniendo en cuenta que la capacidad del rumen es limitada. Por lo tanto, se ha optado por incrementar el contenido en carbohidratos no fibrosos (CNF), es decir, cereales, en la ración (más energía con menos volumen). Estos carbohidratos son rápidamente fermentables y favorecen la producción de ácidos grasos en el rumen, con el consiguiente potencial descenso del pH, lo que incrementa el riesgo de acidosis en el animal. Por ejemplo, en España el cebo intensivo es el típico sistema de engorde de terneros, representando el 75% de los terneros sacrificados (Bacha, 2002). Este sistema se basa en la administración *ad libitum* de dietas con un 85-90% de concentrados (ricos en cereales) y un 10-15% de paja de cebada o de trigo (Bacha, 2002). Una de las principales ventajas del sistema es una velocidad de crecimiento alta la cual permite un ciclo de producción relativamente corto (10-12 meses). Sin embargo, las cantidades elevadas de concentrado administradas aumenta el riesgo de trastornos digestivos, los cuales suponen el 30% de las bajas registradas durante el ciclo productivo. Dentro de ellos, cabe citar como uno de los más comunes la acidosis ruminal, y aunque su afección tiene origen en el rumen, sus repercusiones afectan a todo el individuo, llevando a unas pérdidas económicas importantes (Hernández-Bermúdez, 2002).

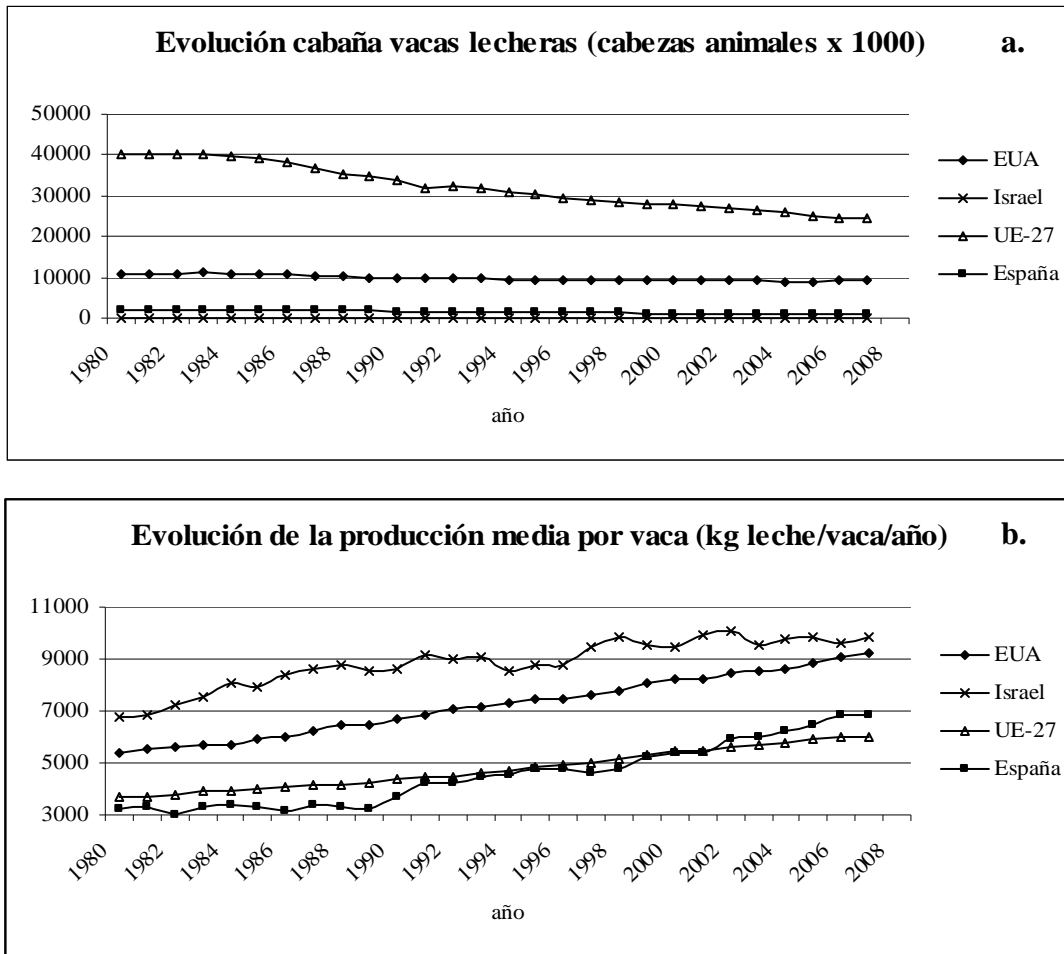


Figura 1. Evolución de la cabaña de vacas lecheras (a) y del rendimiento medio por vaca (b) en Estados Unidos (EUA), Israel, Unión Europea (UE-27) y España entre 1980 y 2007. Fuente: FAOSTAT (<http://faostat.fao.org>).

Existen pocos estudios referentes a la incidencia y al coste de la acidosis ruminal. En Europa, un estudio realizado en 18 explotaciones de vacas lecheras en Holanda observó una prevalencia media del 13,7% de animales con acidosis, aunque cuatro de las granjas presentaron una incidencia superior al 30% (Kleen, 2004. Figura 2). En Estados Unidos, la incidencia de acidosis ruminal subclínica se sitúa entre el 20 y el 40%. Oetzel y col. (1999) encontraron una incidencia del 20% de acidosis subclínica en los animales evaluados mediante ruminocentesis en 14 granjas de Wisconsin. Garret y col. (1997) estudiaron la acidosis en 15 explotaciones de vacas lecheras de los Estados Unidos, y encontraron valores de pH inferiores a 5,5 en el 19% de las vacas al inicio de lactación y en el 26% de las vacas en el pico de lactación. Además, en un tercio de los rebaños la incidencia era superior al 40%.

En conjunto, la incidencia se sitúa entre el 14% y el 30% (Tabla 1), y el coste económico se estima alrededor de 1,12 dólares por día en vacas lecheras (Stone, 1999) y de 9,40 a 20 dólares por ternero en cebo (Schwartzkopf-Genswein y col., 2003; Stock y Britton, 1993). Por lo tanto, si asumimos una incidencia similar, en España esperaríamos unas pérdidas anuales en concepto de acidosis de 35 y 6 millones de euros en vacas y terneros, respectivamente. Stone (1999) calculó el impacto económico de reducir la incidencia de acidosis subclínica en una explotación estadounidense como respuesta a un cambio de ración y el consecuente aumento de pH ruminal. La producción de leche aumentó en 2,7 kg/día y el contenido en grasa y proteína en 0,3 y 0,1 puntos de porcentaje, respectivamente. El aumento de producción y el cambio de composición resultaron en un aumento de los ingresos de 20.000 dólares/mes. El coste económico asociado a la acidosis subclínica en el sector norteamericano se sitúa alrededor de 500 - 1.000 millones de dólares anualmente. En Australia, se ha estimado que el coste anual de la acidosis láctica en los cebaderos de terneros es superior a 9 millones de dólares (Shu y col., 1999).

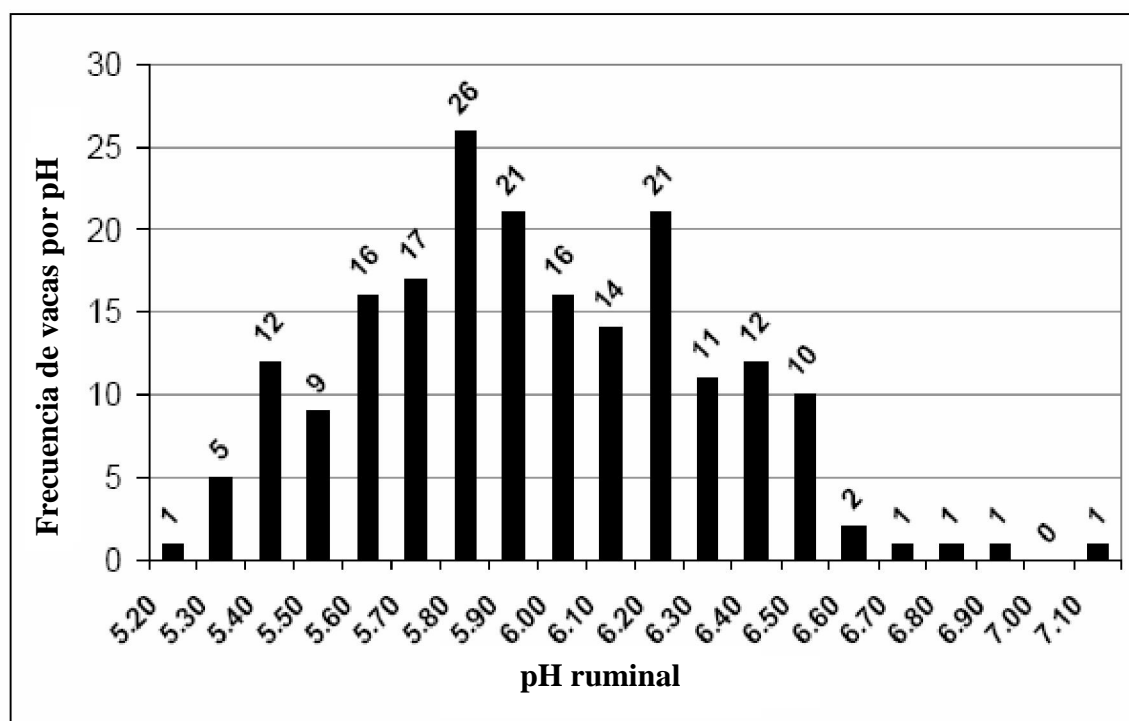


Figura 2. Frecuencia del pH ruminal observado en el total de vacas examinadas: 27 vacas de las 197 (13,7%) presentaban un pH igual o inferior a 5,5, el pH mínimo observado fue de 5,2 y el máximo de 7,1. Fuente: Kleen (2004).

Tabla 1. Estudios referentes a la incidencia de acidosis ruminal.

PAÍS	ACIDOSIS (%)	ANIMAL	REFERENCIA
España	30,0	terneros	Hernández-Bermúdez, 2002
Holanda	13,7	vacas	Kleen y col., 2003
EUA	26,2	vacas	Garret y col., 1997
EUA	19,3	vacas	Oetzel y col., 1999

2. DEFINICIÓN DE LA ACIDOSIS RUMINAL

La acidosis se define como una disminución en el álcali (base) en relación al contenido de ácido (iones hidrógeno), en un primer lugar en el rumen y, en estado más avanzado, en los distintos fluidos corporales (Stedman, 1982; citado por Owens y col., 1998). La acidosis puede ir de subaguda a aguda y se ha relacionado con varios desórdenes secundarios, como laminitis, poliencefalomalacia, rumenitis y abscesos hepáticos (Brent, 1976).

3. ETIOLOGÍA DE LA ACIDOSIS RUMINAL

3.1. Introducción

La acidosis ruminal es un trastorno del rumen de origen alimentario que puede afectar tanto a vacuno de engorde como a vacas lecheras (Oetzel, 2003a). Este proceso deriva de una acumulación excesiva de ácidos grasos volátiles (**AGV**) en el rumen y de su posterior absorción hacia el torrente sanguíneo (Huntington, 1988). Esta acumulación de AGV puede ser debida a diversos factores, los cuales se pueden agrupar en 3 categorías: 1) una ingestión excesiva de CNF, 2) una aportación insuficiente de sustancias tampón en el rumen, y 3) una inadecuada adaptación a dietas altamente fermentables (Oetzel, 2003b).

1. Ingestión excesiva de CNF.

La ingestión excesiva de CNF es una de las causas más evidentes de la acidosis ruminal, y deriva del interés que tienen los actuales sistemas productivos en alcanzar unos

niveles de producción altos. Para conseguirlo, es necesario aumentar los niveles de energía en forma de carbohidratos, que a menudo van acompañados por deficiencias en el contenido de fibra efectiva en la dieta (Oetzel, 2003b). Como resultado de la fermentación de estos sustratos se obtiene una alta concentración de AGV en el rumen. En realidad, la cantidad total de CNF ingeridos es, probablemente, más importante que su porcentaje en la dieta. Oetzel (2003a; Tabla 2) comparó 2 estudios con 2 dietas distintas, una para terneros de engorde y otra para vacas al inicio de lactación, y observó que las vacas lecheras recibían una dieta con un porcentaje mayor de forraje y de fibra comparada con la de los terneros. Sin embargo, éstas tenían una mayor ingestión de materia seca resultando, al final, en un consumo total de CNF similar entre los dos grupos. Y, en consecuencia, los valores de pH registrados fueron similares entre las vacas y los terneros independientemente de la relación forraje:concentrado. Por lo tanto, la acidosis depende más de la cantidad total de carbohidratos fermentables que de su porcentaje.

Tabla 2. Comparación de la dieta y del pH ruminal entre terneros de engorde y vacas en lactación. Fuente: Adaptado de Oetzel (2003a).

Parámetros	Terneros^a	Vacas lactantes^b
Animales, peso (kg)	8 terneros Holstein, ~454	8 vacas Holstein, ~636
Estado productivo	Crecimiento compensatorio	Inicio de lactación
Diseño experimental	2x2 diseño <i>cross-over</i>	4x4 diseño cuadrado latino
Media pH ruminal diario ^c	5,99	5,90
Forraje en la dieta, %	26,3	52,9
IMS^d , kg/d	13,2	21,4
FND^e , %	20,0	28,9
CNF ^f , %	58,3	36,9
CNF, kg/d	7,70	6,50

^a Datos adaptados de Prentice ycol. (2000).

^b Datos adaptados de Oetzel y Nordlund (1998).

^c El pH ruminal se midió 1 vez por minuto con un electrodo ruminal y se hizo una media diaria.

^d IMS = ingestión materia seca.

^e FND = fibra neutro detergente.

^f CNF = 100 - %**PB** (proteína bruta) - %FND - %**EE** (extracto etéreo) - %cenizas.

2. Aportación insuficiente de sustancias tampón.

Los rumiantes poseen un complejo sistema para tamponar los ácidos grasos producidos durante la fermentación ruminal. La capacidad tamponante del líquido ruminal depende principalmente de la secreción de saliva. La saliva es rica en sales minerales, particularmente fosfato y bicarbonato (25-71 y 91-125 meq/L secretados por la glándula parótida, respectivamente), los que confieren la capacidad tamponante (Van Soest, 1982). Diariamente, los rumiantes secretan grandes cantidades de saliva. Por ejemplo, una vaca adulta puede llegar a secretar más de 200 litros de saliva al día. No obstante, la cantidad final producida depende de varios factores (González 2005; Tabla 3), como por ejemplo: el porcentaje de materia seca, forraje y fibra efectiva en la dieta, el tamaño de partícula, el nivel de ingestión, el tiempo de rumia, la osmolalidad del plasma, entre otras.

Tabla 3. Factores que influyen en la producción de saliva. Fuente: Adaptado de González (2005).

	Producción de saliva	Bibliografía
Δ MS ^a del forraje de la dieta	Δ	Meyer y col., 1964
Δ Proporción de forraje de la dieta	Δ	Putnam y col., 1966
Δ Tamaño de las partículas en la dieta	Δ	Bailey, 1958 Putnam y col., 1966
Δ Nivel de ingestión	Δ	Putnam y col., 1966
Δ Osmolalidad del plasma	▼	Carter y Grovum, 1990
Δ Tiempo de rumia	Δ	Bailey y Balch, 1961 Erdman, 1988
Δ FND efectiva	Δ	Allen, 1997

^aMS = materia seca.

Algunos autores han estimado que la saliva puede neutralizar aproximadamente entre el 30 y el 50% del total de los AGV producidos en el rumen (Allen, 1997; Kay, 1966). Allen (1997) calculó la capacidad tamponante de la saliva sobre los AGV producidos en 4 dietas teóricas. Observó que la capacidad tampón iba de 38.912 a 41.192 meq/d y la cantidad de AGV producidos de 74.519 a 89.423. Este autor concluyó que la saliva

producida por el animal tenía la capacidad de tamponar aproximadamente el 50% (46-55%) del total de AGV producidos, a pesar de las diferencias entre dietas (Tabla 4).

Tabla 4. Predicción de la producción diaria de ácidos producidos de la fermentación y capacidad tampón de la saliva en 4 dietas distintas ^{a,b}. Fuente: Adaptado de Allen (1997).

	DIETAS			
	A	B	C	D
Degradación ruminal MO, %	50	60	50	50
Índice longitud partículas	2	2	1	2
FND del forraje, %MS	20	20	20	24
Tiempo masticación total, min/d	622	622	462	659
Tiempo rumia, min/d	388	388	288	402
Tiempo comer, min/d	234	234	174	257
Flujo saliva, L/d	269	269	256	271
Capacidad tampón de la saliva, meq/d	40.888	40.888	38.912	41.192
AGV producidos, meq/d	74.519	89.423	74.519	74.519
Ratio ^c	0.55	0.46	0.52	0.55

^a IMS = 22 kg/d, FND = 30% MS y **MO** (materia orgánica) = 91% MS.

^b A = Dieta con digestibilidad moderada de MO y FND.

B = Dieta con mayor digestibilidad de la MO respecto la dieta A.

C = Dieta con menor tamaño de partícula respecto la dieta A.

D = Dieta con mayor cantidad de FND respecto la dieta A.

^c Ratio = Capacidad tampón de la saliva (meq/d)/AGV producidos (meq/d).

3. Adaptación inadecuada a dietas altamente fermentables.

Una adaptación inadecuada a dietas rápidamente fermentables puede también ser causa de acidosis. El mayor riesgo existe cuando se hace un cambio brusco al introducir grandes cantidades de concentrado a animales que consumían una dieta forrajera, es decir, cuando no existe adaptación. Un periodo de transición es necesario para la adaptación de las poblaciones microbianas y de las papilas ruminales.

En primer lugar, es necesario un periodo de tiempo suficientemente largo que permita la adaptación de las poblaciones microbianas del rumen. El aumento de carbohidratos rápidamente fermentables en la dieta de los rumiantes favorece el crecimiento bacteriano en el rumen. En consecuencia, incrementa la producción de AGV por parte de estas bacterias, llevando a una disminución del pH ruminal (Figura 3). En estas situaciones, la bacteria predominante es, a menudo, *Streptococcus bovis* (productora de lactato), gracias a su capacidad de digerir almidón y su tolerancia a condiciones ácidas (Hungate, 1966; Marounek y Bartos, 1987). Asimismo, los protozoos ciliados pueden producir más lactato y menos butirato o acetato cuando hay cantidades altas de carbohidratos rápidamente fermentables (Williams, 1986). La acumulación de lactato provoca un descenso importante del pH ruminal ($\leq 5,0$) debido al bajo pKa de éste (3,9) comparado con el pKa de los AGV (4,7-4,9). Además, *S. bovis* es relativamente ácido-resistente y puede proliferar y continuar produciendo lactato a pH bajos, contribuyendo a la caída del pH (Russell y Dombrowski, 1980), pudiendo llegar a la situación de acidosis ruminal. Al disminuir el pH, se produce un cambio paulatino de las bacterias gram negativas predominantes en un rumen a pH fisiológico a las bacterias gram positivas *S. bovis* y lactobacilli. Finalmente, cuando se produce una mayor reducción del pH se inhibe también el crecimiento de *S. bovis* pasando a ser un monocultivo de lactobacilos (Figura 4; Nocek, 1997). El ritmo de cambio de poblaciones depende de distintos factores, estando muy relacionado al incremento de sustratos altamente fermentables, pudiendo llegar a producirse en 24 horas (Dawson y Allison, 1988). Este ritmo de cambios es importante, por ejemplo, en las bacterias relacionadas con el metabolismo del lactato, ya que la tasa de crecimiento de las bacterias utilizadoras de lactato es más baja que la de las bacterias productoras de lactato. Por lo tanto, el aumento brusco de los carbohidratos en una dieta conduce al desarrollo rápido de las bacterias productoras de ácido láctico mientras que las bacterias utilizadoras de ácido láctico requieren más tiempo. Esta falta de sincronización conlleva a un desequilibrio microbiano entre las bacterias productoras y las utilizadoras de lactato (Oetzel, 2003b) que conduce a la acumulación de ácido láctico. Pero si se permite un periodo de adaptación suficiente para que las poblaciones formadoras (*S. bovis*) y las utilizadoras (ej. *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium* spp. *lactilytica*) de lactato se equilibren, y el lactato producido se metabolice al mismo tiempo, la concentración de ácido láctico en el contenido ruminal es muy baja (Dehority y Orpin, 1988). En este sentido, algunos estudios microbiológicos sugieren un tiempo alrededor de 10-21 días

para adaptar las poblaciones microbianas (Warner, 1962; Mackie y Gilchrist, 1979), aunque otros autores han observado que a los 21 días todavía no se han estabilizado (Grubb y Dehority, 1975).

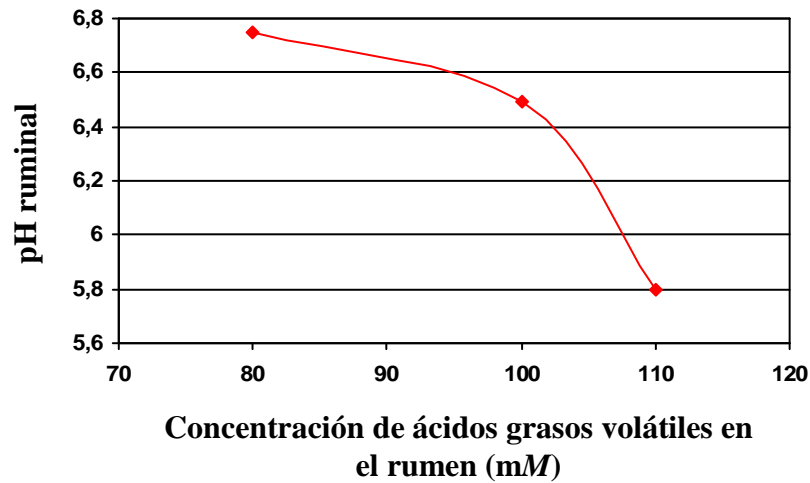


Figura 3. Relación entre pH y concentración de ácidos grasos volátiles en el rumen. Fuente: Russell (2002).

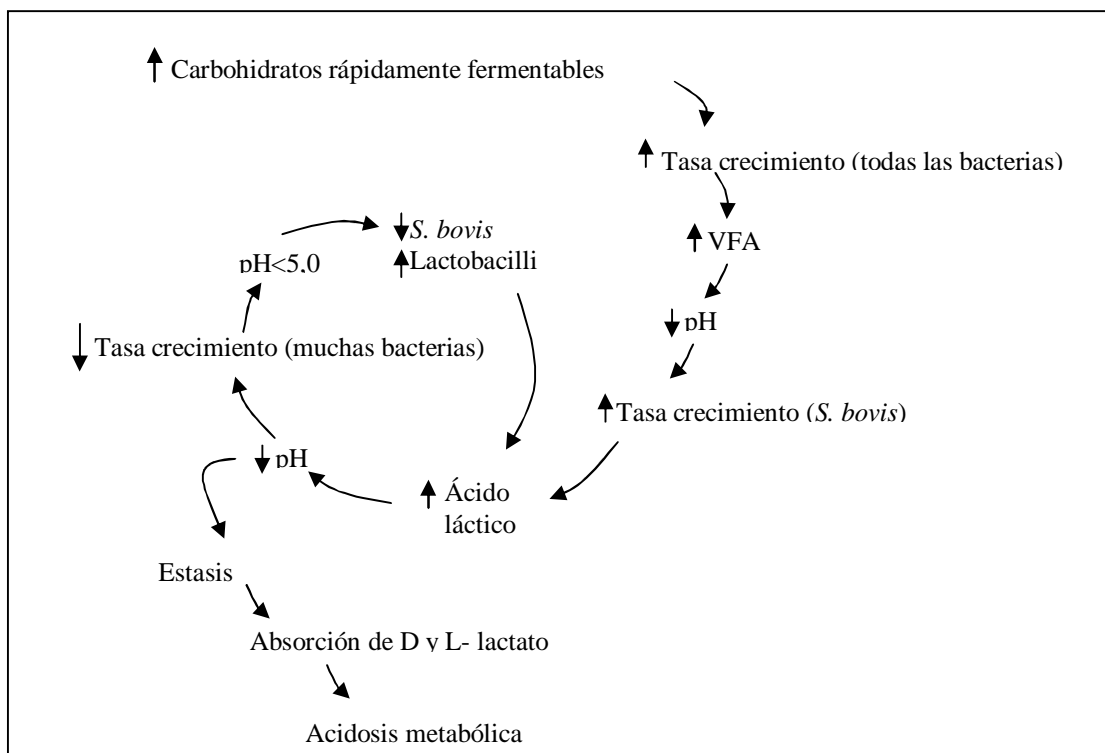


Figura 4. Eventos asociados con la aparición de la acidosis aguda. Fuente: Adpatado Nocek (1997).

El lactato tiene dos isómeros, el L-lactato y el D-lactato. Las enzimas que oxidan al primero (L-lactato deshidrogenasa) están ampliamente distribuidas en el citosol de los tejidos animales. En cambio, el D-lactato tiene que atravesar primero la membrana mitocondrial antes de poder ser oxidado por la enzima D-2-hidróxido-ácido deshidrogenasa, se degrada más lentamente y, consecuentemente, se considera más tóxico. A un pH de 6,0 la proporción del isómero D-lactato representa el 20% del total del lactato producido en el rumen. En cambio, a un pH < 5,0 puede llegar a representar el 50% (Dawson y Allison, 1988). Es decir, cuando el pH ruminal es bajo, no sólo se produce más ácido láctico, sino que este es más difícil de metabolizar y, como consecuencia, se acumula.

En segundo lugar, también es conveniente una adaptación progresiva a una dieta altamente fermentable para permitir el crecimiento de la longitud de las papilas ruminales, puesto que la tasa de absorción de AGV está positivamente correlacionada con el área superficial de las papilas, la cual se ve afectada por la dieta (Dirksen y col., 1985). Si el tiempo de adaptación no es suficiente, las papilas no se alargan de manera apropiada, y el pH ruminal puede descender, no por el exceso de producción de AGV, sino por la incapacidad del rumen para absorberlos. El área de absorción de las papilas puede llegar a aumentar de 10mm² a 60mm² cuando están expuestas a raciones altas en concentrado, pero este proceso puede llevar de cuatro a seis semanas (Nordlund, 2003). La estimulación provocada por los diferentes AGV no es la misma, siendo el butirato el ácido con mayor efecto estimulador de las papilas ruminales seguido por el propionato (Heinrichs, 2005). Sin embargo, Reynolds y col. (2004) observaron otro efecto en las papilas ruminales al introducir concentrado en la dieta; por un lado, el número de papilas aumentó, pero su anchura y superficie disminuyó, resultando en la misma superficie total de absorción que en el grupo control.

3.2. Papel de *Streptococcus bovis*, *Megasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium* en el desarrollo de la acidosis láctica

Streptococcus bovis es una bacteria que normalmente se encuentra en bajo número en el rumen (Mantovani y Russell, 2001), pero su número puede aumentar rápidamente si se cambia bruscamente la dieta del animal de forrajera a concentrada. Esta bacteria tiene una actividad amilasa muy elevada, crece rápidamente y puede desplazar al resto de

bacterias cuando la dieta es rica en almidón. Además, *S. bovis* produce acetato, formiato y etanol cuando las concentraciones de carbohidratos en la dieta son bajas, pero cuando la disponibilidad de hidratos de carbono altamente fermentables es elevada, tiene una fermentación homoláctica, debido a la inhibición de la piruvato formiato liasa a pH ácidos (Figura 5). El lactato es un ácido más fuerte (menor pKa) que los AGV, y su acumulación causa un descenso marcado del pH ruminal (Slyter, 1976). Además, *S. bovis* se caracteriza por ser ácido-resistente (Hungate, 1966; Marounek y Bartos, 1987). Lo que confiere a *S. bovis* tolerancia al ácido es el hecho de que esta bacteria es capaz de disminuir el pH intracelular al disminuir el pH extracelular, pero siempre manteniéndose por encima de éste. Por lo tanto, *S. bovis* mantiene un pequeño gradiente de pH a través de la membrana celular, lo que permite prevenir la acumulación intracelular de aniones (Russell y Wilson, 1996).

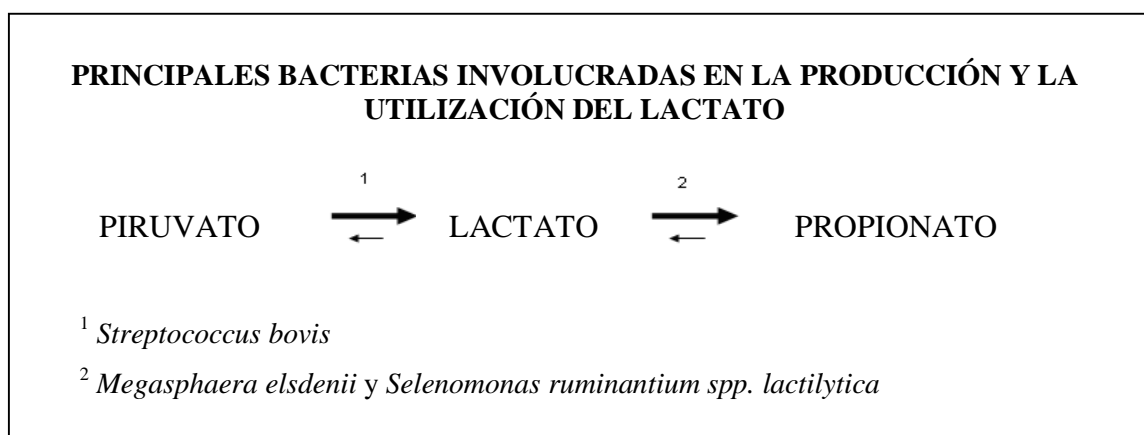


Figura 5. Principales bacterias involucradas en la producción y la utilización del lactato.

Por otra parte, las especies utilizadoras de lactato, como pueden ser *M. elsdenii* o *S. ruminantium* spp. *lactilytica*, pueden reducir el riesgo de acidosis convirtiendo parte del lactato a acetato y propionato (Figura 5). *Megasphaera elsdenii* es una bacteria gram negativa que se encuentra principalmente en el rumen de animales jóvenes (Hobson y col., 1958) y en animales que reciben raciones altas en concentrado, en los que la producción de lactato asume particular importancia. Esta bacteria contribuye un $74 \pm 13\%$ a la fermentación del lactato, aunque está influenciada por el tipo de dieta administrada y por el animal (Counotte y col., 1981 y 1983). Además, su actividad no está sujeta a la represión por parte de la glucosa o maltosa, y su contribución al

catabolismo del lactato incrementa como respuesta a la administración de carbohidratos solubles, los cuales sí que reprimen la función de *Selenomonas* y otras bacterias utilizadoras de lactato (Counotte y col., 1981). Sin embargo, el crecimiento de *M. elsdenii* es más lento que el de *S. bovis*. Por lo tanto, en las primeras fases de un cambio de dieta de forrajera a concentrada existe un riesgo de acidosis por un desequilibrio de número entre ambas. Además, *M. elsdenii* y *S. ruminantium* no crecen bien a pH inferiores a 5,6, por lo que en situaciones más extremas de acidosis desaparecen, y permiten la acumulación de láctico y la reducción del pH.

4. TIPOS DE ACIDOSIS RUMINAL

Según la severidad de la acidosis, basándonos en el pH ruminal, el tipo de ácido responsable de la bajada del pH, y la presencia o no de signos clínicos, se pueden diferenciar dos tipos de acidosis ruminal: aguda y subclínica (Nagaraja y Titgemeyer, 2007).

4.1. Acidosis ruminal aguda

El ganado vacuno puede desarrollar una acidosis ruminal aguda cuando es sometido a un cambio brusco de dieta forrajera a concentrada. Esta indigestión puede explicarse en buena medida por el sobrecrecimiento de *S. bovis*.

La acidosis aguda se caracteriza por un pH ruminal muy reducido ($\leq 5,0$), un aumento importante en la concentración de ácido láctico, un aumento de la concentración de AGV y una disminución de la población de protozoos (Nocek, 1997). Si la acumulación de lactato es muy elevada, los animales pueden morir por hemoconcentración y acidosis metabólica, a consecuencia del desplazamiento del agua del torrente sanguíneo al rumen para compensar el equilibrio iónico. El diagnóstico de la acidosis clínica tiene lugar cuando se determina un pH sanguíneo inferior a 7,35, aunque muchas veces se utilizan como rutina otros síntomas clínicos indicadores de acidosis en un animal, como puede ser: pH ruminal bajo ($< 5,2$), anorexia, oscilaciones en la ingesta de materia seca, diarrea y letargia (Owens y col., 1998).

4.2. Acidosis ruminal subclínica

Este tipo de acidosis es un desorden de la fermentación ruminal no agudo. En la literatura no hay consenso en la nomenclatura: acidosis ruminal subclínica, subaguda o crónica (Kleen y col., 2003). La acidosis ruminal subclínica es consecuencia de la administración continuada de dietas ricas en carbohidratos altamente fermentables y pobres en componentes fibrosos, que resulta en una elevada producción de AGV. Se caracteriza por caídas intermitentes del pH ruminal a niveles no fisiológicos (entre 5,2 y 5,6) durante varias horas post-alimentación, pero el pH se recupera a los valores normales en cada ciclo de alimentación. Estas bajadas sucesivas de pH ruminal alteran la fermentación pero no llegan a provocar sintomatología clínica al animal. Sin embargo, la ingestión de alimento y la producción de los animales se reducen y/o son irregulares (Owens y col., 1998), lo que ocasiona pérdidas económicas. Además, el rendimiento de los animales también se puede ver afectado por varios problemas sanitarios asociados a este proceso, como son la laminitis, la rumenitis y los abscesos hepáticos (Nocek, 1997; Kleen y col., 2003). Estos problemas no solamente tienen importancia económica, sino que además comprometen el bienestar animal.

5. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ACIDOSIS RUMINAL

5.1. Introducción

Los factores susceptibles de ser modificados con el fin de reducir la incidencia de acidosis clínica o subclínica se muestran en la Tabla 5. Estos factores se agrupan, principalmente, en tres bloques: a) composición de la dieta, b) manejo de los animales y, c) aditivos.

a) Composición de la dieta.

La composición de la dieta tiene un papel muy importante en el riesgo de acidosis, principalmente por lo que hace referencia al nivel de concentrado y de fibra efectiva. La intensificación de la producción en los últimos años, ha llevado a un aumento en la inclusión de CNF y una disminución de la fibra en las raciones con el objetivo de aumentar el aporte energético de los animales. El NRC (2001) propone que los

niveles de CNF no debería sobrepasar el 35-45%, y recomienda un mínimo de fibra neutro detergente entre 27-33% (de la cual un 70-80% tiene que provenir de forrajes), para asegurar una buena estimulación de la masticación y la rumia, y evitar la aparición de trastornos digestivos. Sin embargo, los estudios referentes a los niveles de inclusión de CNF en las raciones presentan resultados muy heterogéneos (Tabla 6), por lo tanto, es difícil determinar cuál es su nivel óptimo.

Además, también son importantes el tipo de grano y el tipo de conservación o procesado. Hay cereales que predisponen más a la acidosis que otros, dependiendo de su estructura química, que determinará el perfil y velocidad de su fermentación (Figura 6). También, tanto los procesados térmicos como las moliendas finas aumentan, en general, el riesgo de acidosis porque aumentan la velocidad de fermentación del almidón. Asimismo, los ensilados predisponen más a la acidosis que los henos, ya que aportan una carga adicional de ácido en el rumen y tienen un tipo de fibra más frágil.

Tabla 5. Factores susceptibles de ser modificados con el fin de reducir la incidencia de acidosis clínica o subclínica. Fuente: Adaptado de Owens y col. (1998).

Factor	Escala de riesgo		Impacto		
	Bajo	Alto	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>Feedlot</i>
Manejo					
Carácter del ganado	Tranquilo/Dócil	Asustadizo	?	?	Moderado
Tamaño comida	Pequeño	Grande	Fuerte	Fuerte	Fuerte
Acceso a la comida	Limitado	Ilimitado	Fuerte	Fuerte	Limitado
Composición dieta					
Nivel de concentrado	0%	100%	Fuerte	Fuerte	Fuerte
Grano	Maíz, Sorgo	Trigo	Fuerte	Fuerte	Fuerte
Procesado del grano	Entero	Procesado	Fuerte	Fuerte	Fuerte
Tipo de alimento	No fermentado	Fermentado	Débil	?	?
Balance cationes-aniones	Ácido	Básico	Débil	?	?
Aditivos					
Ionóforos	Presencia	Ausencia	Fuerte	Fuerte	Fuerte
Bicarbonato	Presencia	Nada	Débil	Débil	Débil
Grasa	Más del 8%	Nada	Débil	Negativo	Nada
Probióticos	Lactobacilli	Nada	Moderado	Poco	?
Estimulantes protozoarios	Presencia	Ausencia	Fuerte	Fuerte	?
Nivel de proteína	Alto	Bajo	Débil	Débil	?
Tiamina	Suplementación	Nada	Débil	Débil	?
Virginiamicina	Presencia	Ausencia	Fuerte	Fuerte	Moderado
Malato/Fumarato	Presencia	Ausencia	Fuerte	Moderado	Débil

Tabla 6. Efecto del aumento de los carbohidratos no fibrosos en la ración (%) de vacas lecheras sobre la ingestión, la producción y la composición de leche, la digestibilidad del almidón (DA) y el pH ruminal.

Referencias	CNF (%)	IMS (kg/d)	Leche (kg/d)	GB ^a leche (%)	PB leche (%)	DA (%)	pH
Batajoo y Shaver, 1994	24-42	↑	=	=	↑	↓	↓
Beckman y Weiss, 2005	40-48	=	=	↓	=	↓	=
Harmison y col., 1997	39-48	↑	=	=	=	=	-
Minor y col., 1998	42-47	=	↑	↓	↑	-	-
Rabelo y col., 2003	41-47	=	=	=	=	-	↓
Sarwar y col., 1992	21-32	=	=	=	↑	-	=
Schwab y col., 2006	30-40	=	↑	↓	=	=	=
Sievert y Shaver, 1993a	36-42	=	=	=	=	-	=
Sievert y Shaver, 1993b	35-42	↑	=	↓	=	-	↓

^aGB = grasa bruta.

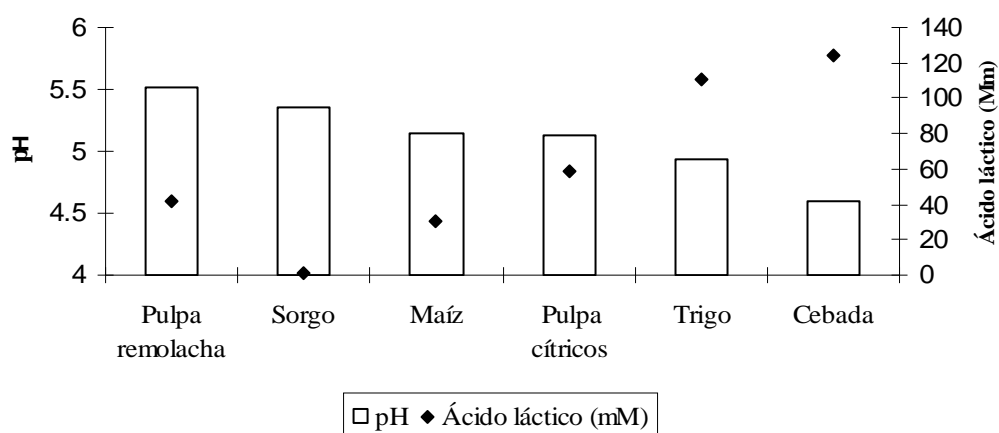


Figura 6. Concentraciones de ácido láctico y pH después de 12 h de fermentación *in vitro* de varias materias primas. Fuente: Cullen y col. (1986).

b) Manejo de los animales.

El manejo de los animales y el de su alimentación pueden influir en el pH ruminal final. Por un lado, cabe destacar el carácter de los animales, si existe o no competencia entre ellos, la accesibilidad a los comederos (*ad libitum* o no), y el número y el tamaño de las comidas.

La frecuencia de alimentación tiene un impacto importante sobre el pH ruminal. Es recomendable ofrecer la ración a los animales en varias tomas al día, ya que se ha observado que aumentar la frecuencia de alimentación disminuye el riesgo de acidosis (Kaufmann, 1976; French y Kennelly, 1990. Figura 7). Se considera que 2 veces al día es suficiente si se utilizan dietas totalmente mezcladas, en caso contrario, se recomienda ir alternando las tomas de concentrado con las de forraje (Bach, 2002). Sin embargo, algunos autores no han constatado cambios (Bunting y col., 1987), e incluso, algunos estudios han observado efectos contrarios, es decir, cuando incrementaban la frecuencia de alimentación el pH ruminal medio disminuía, aunque las fluctuaciones de pH fueran más pequeñas (Sutton y col., 1986; Yang y Varga, 1989).

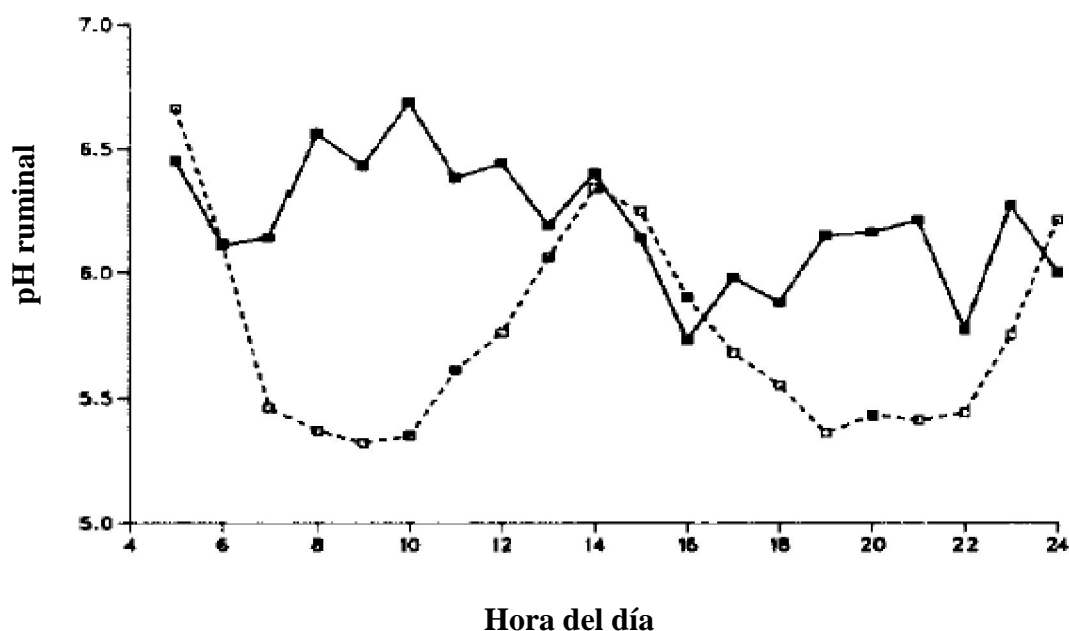


Figura 7. Efecto de la frecuencia de alimentación sobre el pH ruminal: 2 veces al día (--□--) y 12 veces al día (—■—). Fuente: French y Kennelly (1990).

Además, para hacer un cambio de ración de forrajera a concentrada a los animales, es recomendable hacerlo de forma progresiva, para permitir el crecimiento de las bacterias utilizadoras de ácido láctico y el desarrollo de las papilas ruminales, ya que una adaptación inadecuada a dietas rápidamente fermentables puede también ser causa de acidosis. En primer lugar, es necesario un periodo de tiempo suficientemente largo que permita la adaptación de las poblaciones microbianas del rumen. La tasa de crecimiento de las bacterias utilizadoras de lactato es más baja que la de las bacterias productoras de lactato, lo que puede llevar a un desequilibrio en el metabolismo del lactato resultando en acidosis ruminal. Por lo tanto, es conveniente evitar el aumento brusco de los carbohidratos en una dieta, con el fin de impedir un desequilibrio microbiano entre las bacterias productoras y las utilizadoras de lactato (Oetzel, 2003b). En este sentido, estudios microbiológicos sugieren un tiempo alrededor de 10-21 días para adaptar las poblaciones microbianas (Warner, 1962; Mackie y Gilchrist, 1979), aunque como hemos visto anteriormente no siempre es suficiente (Grubb y Dehority, 1975); y los niveles de concentrado deberían aumentarse progresivamente en intervalos de 5-7 días (Nordlund, 2003). En segundo lugar, también es conveniente una transición progresiva a una dieta altamente fermentable para permitir el crecimiento de la longitud de las papilas ruminales, puesto que la tasa de absorción de AGV está positivamente correlacionada con el área superficial de las papilas, la cual se ve afectada por la dieta (Dirksen y col., 1985). Si el tiempo de adaptación no es el suficiente, las papilas no se desarrollan de manera apropiada, y el pH ruminal puede descender, no por el exceso de producción de AGV, sino por la incapacidad del rumen para absorberlos. El área de absorción de las papilas puede llegar a aumentar de 10mm^2 a 60mm^2 cuando están expuestas a raciones altas en concentrado, pero este proceso puede llevar de cuatro a seis semanas (Nordlund, 2003). La estimulación provocada por los diferentes AGV no es el mismo, siendo el butirato el ácido con mayor efecto estimulador de las papilas ruminales seguido por el propionato (Heinrichs, 2005). Sin embargo, Reynolds y col. (2004) observaron otro efecto en las papilas ruminales al introducir concentrado en la dieta; por un lado, el número de papilas aumentó, pero su anchura y superficie disminuyó, resultando en la misma superficie total de absorción que en el grupo control.

c) Aditivos.

Existen gran variedad de aditivos para proteger a los animales de la acidosis ruminal: ionóforos, sustancias tampón, alcalinizantes, ácidos orgánicos, plantas y sus extractos, probióticos, prebióticos e inmunización. A continuación se describen con más detalle cada uno de ellos.

5.2. Aditivos usados para la prevención de la acidosis

5.2.1. Sustancias tampón

El concepto de añadir sustancias tampón en el rumen nace en la década de los cincuenta (Wheeler y col., 1980). Un tampón es una sustancia que tiene la capacidad de aumentar la cantidad de iones hidrógeno necesaria para disminuir el pH de una solución, es decir, aporta una resistencia al cambio de pH. El más utilizado en producción animal es el bicarbonato. Se recomienda usarlo a niveles alrededor del 1% en base a MS (Sauvant y col., 2006).

Se han realizado muchos estudios de incorporación de bicarbonato en la dieta de rumiantes. Varios autores han documentado aumentos en el pH ruminal cuando se administraba el bicarbonato sódico, aunque los resultados son inconsistentes (Tabla 7). En una revisión reciente de 81 experiencias en vacas lecheras usando tampones, Meschy y col. (2004) observaron un aumento medio de $0,12 \pm 0,19$ unidades en el pH ruminal. Asimismo, en la revisión realizada por Erdman (1988), se observó que en 10 estudios realizados en vacas lecheras con unas dietas que contenían menos del 30% de forraje (13,5% fibra ácido detergente, **FAD**) y un nivel de inclusión de bicarbonato alrededor del 2,48% MS, el pH ruminal aumentó de media 0,22 unidades en los grupos que recibieron el bicarbonato comparando con los grupos control (6,53 vs. 6,31, respectivamente). En cambio, la respuesta del bicarbonato no fue tan positiva en raciones con más del 30% de forraje. Asimismo, se analizó el efecto del bicarbonato en varios tipos de forraje, y se observó que el efecto del bicarbonato era mayor en dietas a base de ensilado de maíz que en dietas con heno de alfalfa. Además de ver efectos sobre el pH, se observó que la inclusión de bicarbonato en vacas lecheras aumenta el porcentaje de grasa en la leche entre 0,3 - 0,4 unidades, que se relaciona con el aumento de la ratio acetato:propionato. La Figura 8 muestra la efectividad del bicarbonato de sodio en aumentar el porcentaje de grasa de la leche según el nivel de FAD de la ración.

Tabla 7. Efecto sobre el pH de la inclusión de bicarbonato de sodio (B) versus el control (C) en varios estudios.

Estudios	Animal	% inclusión	C	B	P-valor ^a
Erdman y col., 1980	vacas	1,50	6,46	6,52	NS
Russell y col., 1980	terneros	0,90	6,60	6,70	NS
Erdman y col., 1982	vacas	1,00	6,17	6,43	NS
Boerner y col., 1987	terneros	-	5,50	5,60	<0,05
Erdman, 1988	vacas	2,48	6,31	6,53	<0,05
Ghorbani y col., 1989	vacas	1,00	6,06	6,24	<0,05
Zinn, 1991	terneros	0,75	5,87	6,23	<0,05
Paton, 2005	terneros	0,70	5,97	5,89	NS

^aNS = no significativo ($P > 0,05$).

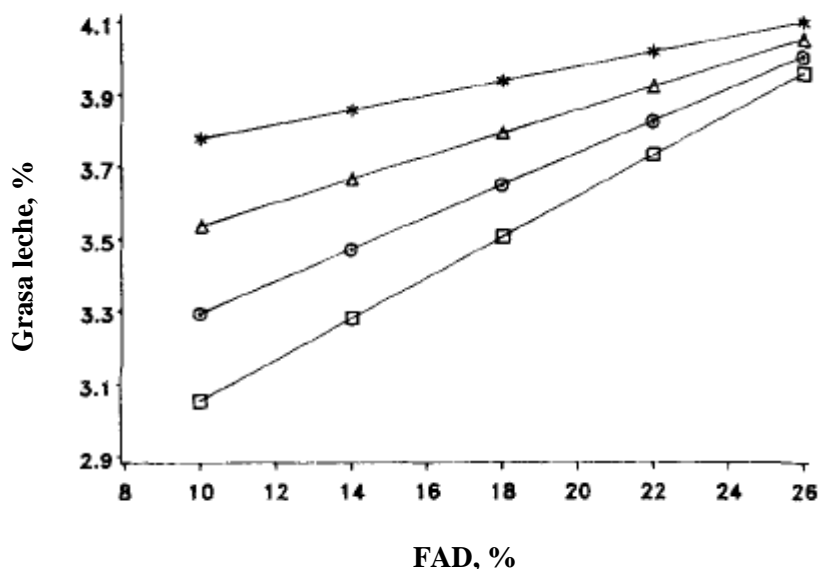


Figura 8. Interacción del contenido de fibra ácido detergente (FAD, %) en la dieta y de la ingestión de bicarbonato sódico (□: 0 g/d, ○: 150 g/d, △: 300 g/d, *: 450 g/d) sobre el contenido de grasa en la leche (%). Fuente: Erdman (1988).

Los efectos del bicarbonato son mayores con menores cantidades de FAD. Por ejemplo, añadir 44 g de bicarbonato de sodio equivale a aumentar un 1% de FAD en la ración. Además, este autor observó una relación lineal positiva entre el pH ruminal y el contenido en FAD de la dieta ($\text{pH} = 5,34 + 0,056 * \text{FAD}\%$, $R^2 = 0,30$). Esto sugiere que la fibra de la dieta se podría considerar como un “equivalente-tamponante”, porque al aumentar la cantidad de FAD de la dieta disminuye la digestibilidad de esta dieta y, en consecuencia, el pH ruminal final es mayor. Por lo tanto, se concluye que los tampones son más efectivos en dietas altas en concentrado que en dietas forrajeras.

Existen varias teorías del modo de acción del bicarbonato. Por un lado, existe la teoría más tradicional, basada en el efecto tamponante por protonización y eliminación del dióxido de carbono en exceso. Por ejemplo, el bicarbonato de sodio tiene una capacidad teórica de consumo de H^+ de 12,2 meq/g. Conforme progresa la fermentación ruminal, los ácidos que se producen en el rumen consumirán bicarbonato para producir agua y dióxido de carbono, mediante la siguiente reacción:



El mecanismo de acción depende de la cantidad de CO_2 disponible en el rumen. A menor cantidad de CO_2 mayor capacidad tampón se consigue en el medio ruminal, ya que la ecuación anterior se desplaza hacia la derecha. El CO_2 soluble en el rumen pasa a formar parte del gas ruminal, y el equilibrio de esta reacción se mantiene en los rumiantes eliminando el exceso de CO_2 a través de la eructación. La cantidad de CO_2 en el líquido ruminal depende de la presión parcial de CO_2 (pCO_2) en la fracción gaseosa del rumen. El pH del rumen puede explicarse mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch (Kohn y Dunlap, 1998):

$$\text{pH rumen} = 7,74 + \log ([\text{HCO}_3^-]/\text{pCO}_2)$$

Kohn y Dunlap (1998) estudiaron el efecto de añadir 3,36 g/L de bicarbonato de sodio en un medio equilibrado a pCO_2 de 0,7 atm y 37 °C (Tabla 8). Los resultados muestran que añadir bicarbonato aumenta el pH, y que el efecto es mayor a pH más bajos. Russell y Chow (1993) criticaron esta teoría e indicaron que la inclusión de bicarbonato en el medio ruminal tiene poco impacto sobre el pH ya que el rumen está saturado de CO_2 , y

proponen otra teoría. Estos autores argumentan que la inclusión de sales tamponantes aumenta el consumo de agua, lo que se traduce en un aumento del ritmo de paso de la fracción líquida. Los CNF son altamente solubles y se encuentran mayoritariamente en la fracción líquida, por lo tanto, también aumenta el flujo de éstos desde el rumen al intestino. En consecuencia, los CNF no son fermentados en el rumen, disminuye la producción de propionato, aumenta la proporción de acetato y, en consecuencia, aumenta el pH en el rumen. Así, los bicarbonatos serían más beneficiosos para los animales que reciben raciones concentradas que forrajeras.

Tabla 8. Efecto de la adición de bicarbonato de sodio (3,36 g/L) sobre el pH. Fuente: Kohn y Dunlap (1998).

Efectos de la adición de NaHCO ₃			
pH inicial	[HCO ₃ -] ¹ esperada	pH esperado	pH observado ²
7,0	0,167	7,12	7,05
6,5	0,080	6,80	6,85
6,0	0,530	6,62	6,64
5,5	0,044	6,54	6,52
5,0	0,041	6,51	6,58

¹Concentración de iones en moles por litro.

²Error estándar = 0,024, n = 3.

5.2.2. Ionóforos

Durante las últimas décadas, los antibióticos ionóforos han sido una de las estrategias más utilizadas en producción animal para la modificación de la fermentación ruminal con el fin de mejorar la eficiencia de utilización de los alimentos. Los aditivos alimentarios antibióticos se clasifican generalmente dentro del grupo de sustancias utilizadas como promotores del crecimiento, siendo la monensina uno de los más estudiados. La monensina, como antibiótico ionóforo que es, es altamente lipofílica y tiene propiedades antibacterianas que resultan de su capacidad de transportar cationes a través de su membrana celular (Bergen y Bates, 1984). Ésta tiene alta selectividad por el sodio (Na⁺), pero también es capaz de translocar potasio (K⁺) y protones (H⁺) (Russell y Strobel, 1989).

En el rumen, el Na^+ es el catión predominante en el medio extracelular, mientras que la concentración de K^+ es cuatro o cinco veces menor, aunque éste sea el catión predominante en el medio intracelular. En presencia de monensina, ésta se solubiliza en la membrana celular y debido al alto gradiente de potasio se observa un movimiento de iones K^+ al medio extracelular y una entrada a la célula de iones H^+ , lo que conlleva a una disminución del pH intracelular. La actividad ATPasa es insuficiente para mantener un pH intracelular alcalino. Una vez el pH se ha revertido, la monensina transporta Na^+ al interior de la célula y H^+ al exterior (Russell y Strobel, 1989. Figura 9). La primera reacción se da a más velocidad que la segunda, por lo tanto la muerte celular suele darse por acidificación del citoplasma (Guffanti y col., 1979), aunque también por el desgaste de ATP (Russell y Strobel, 1989), así como por la disminución de la capacidad de división por falta de potasio para la síntesis de proteína (Davis y col., 1984).

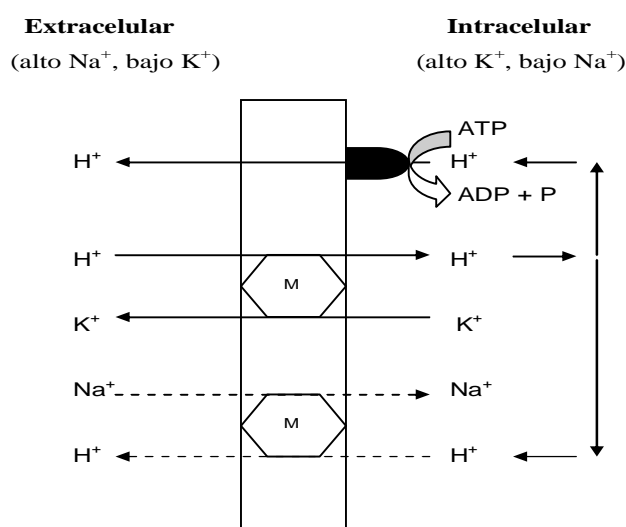


Figura 9. Esquema del mecanismo de acción de la monensina sobre las bacterias gram-positivas ruminales. Fuente: Adaptado de Russell (1987).

Las bacterias gram negativas son, en general, resistentes a los ionóforos, ya que poseen una membrana externa de lipolisacáridos en la pared que les proporciona una superficie de protección hidrofílica que actúa de barrera de moléculas de gran tamaño o lipofílicas, como es el caso de la monensina (Nikaido, 1994). Por el contrario, la monensina es muy efectiva frente a bacterias gram positivas debido a la falta de esa membrana exterior protectora (Figura 10). Estudios *in vivo* (Nagaraja y col., 1982; Plaizier y col., 2000) e

in vitro (Dennis y col., 1981; Tung y Kung, 1993) indican que la monensina ayuda a mantener el pH ruminal inhibiendo la proliferación de *S. bovis* y *Lactobacillus sp.*, bacterias gram positivas y principales productoras de ácido láctico. Al mismo tiempo, *M. elsdenii* y *S. ruminantium spp. lactilytica*, bacterias gram negativas utilizadoras de ácido láctico para convertirlo en acetato y propionato, son resistentes a la monensina (Dennis y col., 1981; Nagaraja y Taylor, 1987). Nagaraja y col. (1982) realizaron un estudio de inducción de acidosis en terneros canulados a los que se les administró monensina. La inducción de acidosis se realizó mediante un ayuno de 24 h seguido por una infusión intraruminal de glucosa (12,5 g/kg peso vivo - **PV**), y el antibiótico (1,3 mg/kg PV) fue administrado juntamente con la solución de glucosa. Los animales tratados presentaron un pH ruminal superior y una concentración de lactato inferior comparados con el grupo control ($P < 0,01$). El recuento de *S. bovis* y *Lactobacillus* incrementó progresivamente después de la administración de glucosa, pero el número se redujo en los animales tratados con monensina. No se observaron diferencias entre tratamientos en el número de bacterias utilizadoras de lactato (Tabla 9). Por lo tanto, las diferencias de sensibilidad entre las bacterias productoras y las utilizadoras de lactato ante la monensina, resultan en una disminución del lactato ruminal, lo que conlleva un incremento en el pH ruminal, siendo una herramienta eficaz contra la acidosis ruminal (Russell y Strobel, 1989). Sin embargo, existen estudios que no han observado cambios en el pH ruminal con el uso de monensina (Mutsvangwa y col., 2002; Osborne y col., 2004). Algunos autores han constatado que algunas bacterias gram-positivas pueden hacerse resistentes a la monensina, como por ejemplo, alguna cepa de *S. bovis* (Dawson y Boling, 1987; Callaway y col., 1999). Como consecuencia, actualmente no está muy clara su efectividad contra las bacterias productoras de lactato.

No obstante, la monensina presenta también otro modo de acción que ayuda a controlar la acidosis. Se ha observado que la monensina modula la ingesta de alimento, reduciendo la variación en los patrones de ingesta, lo que resulta en una reducción de las variaciones del pH ruminal (Baile y col., 1979; Stock y col., 1995; Erickson y col., 2003).

El 1 de enero de 2006 entró en vigor la normativa europea que prohíbe el uso de antibióticos como promotores del crecimiento (Directiva 1831/2003/EC). Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas, en Europa.

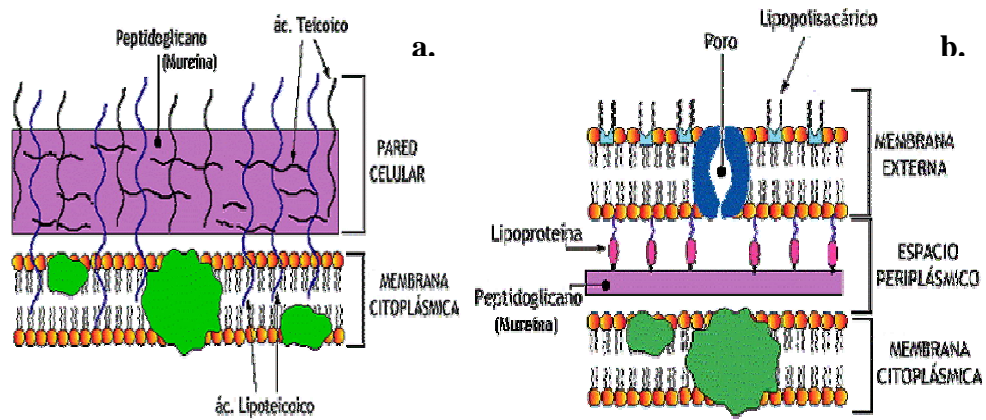


Figura 10. Morfología de la pared celular de bacterias gram-positivas (a) y gram-negativas (b).

Tabla 9. Efectos de la administración de monensina (1,3 mg/Kg PV) sobre el pH, lactato, conteo de colonias de *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus sp.* y bacterias utilizadoras de lactato en líquido ruminal de vacuno inducido a acidosis láctica^a. Fuente: Adaptado de Nagaraja y col. (1982).

Hora	pH		L(+) Lactato (mg/dL)		D(-) Lactato (mg/dL)		<i>Streptococcus bovis</i> (x 10 ⁸ /mL)		<i>Lactobacillus sp.</i> (x 10 ⁸ /mL)		Bacterias utilizadoras lactato (x 10 ⁸ /mL)	
	Control	Monensina	Control	Monensina	Control	Monensina	Control	Monensina	Control	Monensina	Control	Monensina
0	6,98	6,94	7,5	6,5	8,6	6,5	0,015	0,005	0,42	0,21	0,89	0,71
4	4,97	5,65	222,8	57,2	42,4	33,3	6,8	0,6	21,2	2,6	13,5	10,4
8	4,33	5,18	406,8	105,3	91,8	40,2	12,0	0,9	82,3	11,5	110,8	34,5
12	4,13	4,82	486,5	119,0	151,8	47,6	2,1	2,1	16,7	6,6	17,3	25,3

^a La acidosis fue inducida con la administración intraruminal de glucosa (12,5 g/kg PV).

5.2.3. Alcalinizantes

Las sustancias alcalinizantes son una alternativa para la prevención de la acidosis ruminal ya que aumentan el pH de una solución, aunque no tienen la capacidad de mantener una solución a un pH constante. El más destacado en alimentación de rumiantes es el óxido de magnesio (MgO). Le Ruyet y Tucker (1992) estudiaron el efecto de varios tampones y alcalinizantes sobre el pH de líquido ruminal a lo largo de 48 h de incubación, y observaron que MgO aumentaba el pH del rumen, aunque su efecto no era inmediato, observando su máximo después de 24 h de incubación, eso es debido a su baja velocidad de disolución (Figura 11). Además, otro efecto positivo de este compuesto es que al ser rico en magnesio, actúa mejorando la digestibilidad de la fibra al ser un cofactor de las celulasas (Bach, 2002). El principal problema de la suplementación con magnesio es la baja palatabilidad, por lo que los niveles recomendables no son muy altos para no dar descensos en la ingestión de alimentos, y se recomienda su inclusión alrededor del 0,3 - 0,4% (en base a MS).

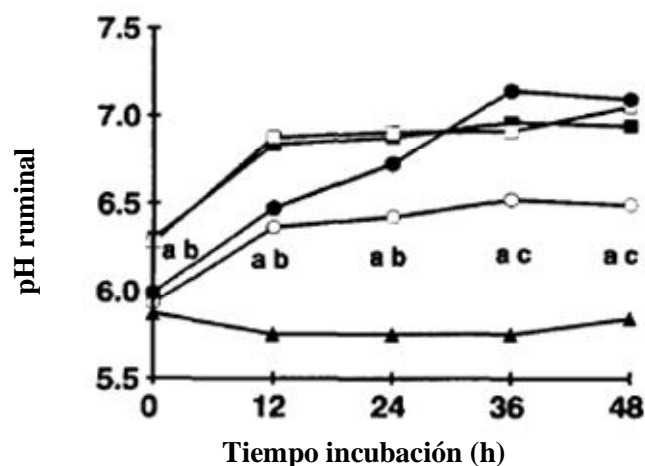


Figura 11. Efecto de distintos tipos de tampones y alcalinizantes (7,1 g aditivo/L) sobre el pH en líquido ruminal durante 48 h de incubación (▲: control, ■: bicarbonato sódico, □: sesquicarbonato natural sódico, ○: mezcla de tampones, ●: óxido de magnesio). Efectos significativos ($P < 0,05$): en cada tiempo de muestreo, a: control versus aditivo, b: tampones sódicos versus otros aditivos, c: mezcla de tampones versus óxido de magnesio Fuente: Le Ruyet y Tucker (1992).

Cuando el óxido de magnesio se usa en combinación con el bicarbonato, sus efectos son aditivos (Erdman y col., 1980, 1982), ya que el alcalinizante puede aumentar el pH, pero tiene el inconveniente de que no lo puede mantener. En cambio, el bicarbonato es una muy eficaz en mantener el pH pero no mucho para aumentarlo. Por lo tanto, una buena alternativa es usarlos conjuntamente para crear sinergia entre ambos, y se recomienda la combinación de bicarbonato y de MgO de 3 a 1, respectivamente (Bach, 2002).

5.2.4. Ácidos orgánicos

Algunos ácidos orgánicos (AO) han demostrado tener un efecto positivo en la fermentación ruminal, y en particular para disminuir la acumulación de ácido láctico y aumentar el pH ruminal. Los AO están presentes de forma natural en tejidos biológicos, ya que son productos intermedios de algunos ciclos metabólicos. En los rumiantes, se utilizan ácidos dicarboxílicos (aspártico, fumárico y málico), los cuales son intermediarios de la vía succínica, por la cual el piruvato se transforma en propionato, evitando la formación de lactato (Figura 12). Cuando se utilizan como aditivos, los ácidos pueden ser administrados como tales, pero al ser líquidos corrosivos su manejo es problemático; por ello, resulta más conveniente la utilización encapsulados o de sus sales, que son sólidas y más fáciles de manipular y dosificar (Caja y col., 2003; Wallace y col., 2006).

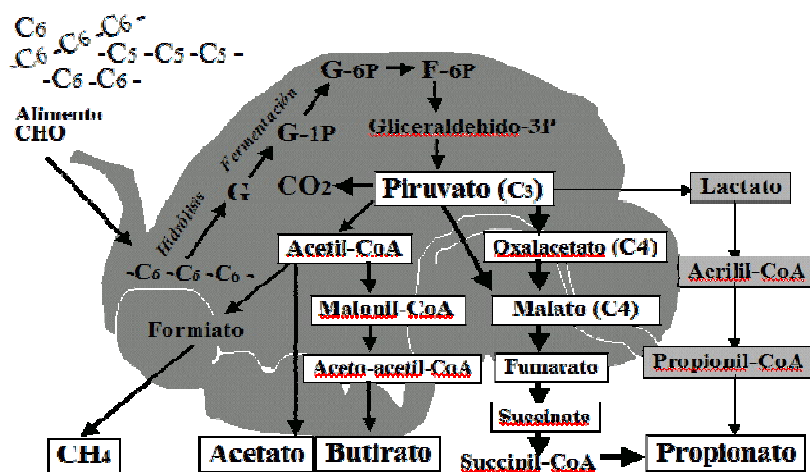


Figura 12. Esquema de la formación y metabolismo de los ácidos orgánicos en el rumen. Fuente: Caja y col. (2003).

El modo de acción de los AO no se conoce totalmente. En monogástricos se han observado modificaciones de la microflora gastrointestinal. Los estudios realizados en ruminantes se encuentran a partir de la década de los noventa y la mayoría se han llevado a cabo *in vitro*.

Estudios *in vitro* han observado que la adición de aspartato, fumarato y malato estimulaban la utilización de lactato y la síntesis del propionato por parte de *S. ruminantium*, multiplicando por dos su crecimiento (Nisbet y Martin, 1990). Linehan y col. (1978) hipotizaron que los ácidos dicarboxílicos estimulaban el crecimiento de *S. ruminantium* en presencia de lactato porque compensan la deficiencia de oxalacetato asociado a la gluconeogénesis. Por un lado, el fumarato y el malato se usan directamente como precursores del oxalacetato y, por otro lado, el aspartato lo puede reemplazar en la síntesis de glucosa. Asimismo, *S. ruminantium* no puede fermentar lactato en presencia de H_2 , pero sí que puede fermentar aspartato, fumarato y malato, disminuyendo finalmente la cantidad de H_2 y así pudiendo fermentar el lactato (Martin, 1998). La administración de AO en las raciones de los animales podría disminuir las concentraciones de ácido láctico en el rumen, y así evitar los descensos acusados de pH y los problemas de acidosis. Otros experimentos también observaron una disminución de las concentraciones de lactato y un aumento de los valores de pH (López y col., 1999; Martin y col., 1999; Carro y Ranilla, 2003. Figura 13).

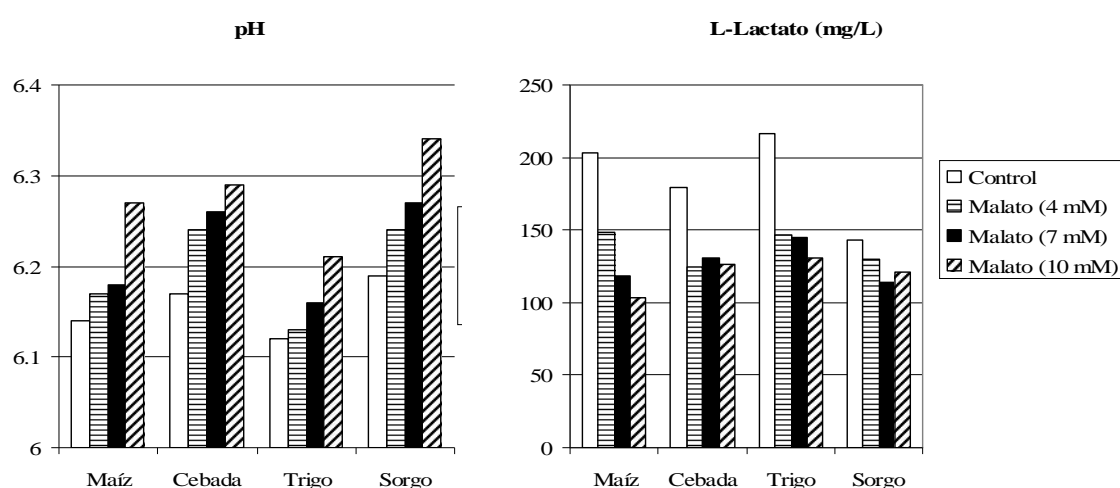


Figura 13. Efectos de la adición de malato sobre el pH y el L-Lactato en condiciones ruminales *in vitro*. Fuente: Adaptado de Carro y Ranilla (2003).

Los estudios realizados *in vivo* con AO en vacuno se limitan al malato y no son muy abundantes. En un estudio de 4 terneros canulados realizado por Montaña y col. (1999) se suplementó una dieta de 77% de copos de avena con 80 g de ácido málico por animal y día, y después de 13 días de adaptación se hizo una infusión ruminal de glucosa y se observó la respuesta de los animales. La adición de ácido málico incrementó el pH ruminal 2 horas post-infusión de glucosa comparado con el grupo control (5,95 y 5,78, respectivamente). Martin y col. (1999) estudiaron el efecto de varias dosis de malato (0, 27, 54 y 80 g/animal/día) en 4 terneros canulados que recibían una dieta 80% concentrado (75% maíz y 25% trigo). Al analizar el pH ruminal y los productos de fermentación a lo largo del día, el pH ruminal ($P < 0,05$) y el acetato ($P \leq 0,10$) incrementaron al aumentar la cantidad de malato, mientras que los AGV totales tendieron a disminuir (Tabla 10). En vacas lecheras los resultados productivos son heterogéneos. Sniffen y col. (2006) estudiaron el efecto del malato (0 vs. 50 g/d) en 40 vacas lecheras Holstein. Los animales tratados registraron un aumento en la producción de leche (39,3 vs. $37,6 \pm 0,5$ kg/d), y en la cantidad de proteína (1,21 vs. $1,15 \pm 0,02$ kg/d) y lactosa (1,90 vs. $1,82 \pm 0,03$ kg/d) sintetizadas por día comparado con el grupo

Tabla 10. Efecto del DL-malato sobre el pH ruminal y productos finales de fermentación en terneros alimentados con una dieta alta en concentrado. Fuente: Martin y col. (1999).

Parámetro	Dosis DL-malato (g/animal/d)				ESM
	0	27	54	80	
pH ^a	5,77	6,01	6,07	6,15	0,05
Acetato, mM ^b	51,3	52,8	53,2	53,7	0,86
Propionato, mM	34,9	31,9	32,7	30,2	2,04
Butirato, mM	9,70	10,7	9,90	11,5	1,04
AGV totales, mM ^b	159,7	152,5	152,3	147,7	3,16
Acetato:Propionato	1,58	1,78	1,70	1,84	0,14
L-lactato, mg/L	14,5	16,9	16,8	16,5	1,64

^aEfecto lineal del DL-malato ($P < 0,05$).

^bEfecto lineal del DL-malato ($P \leq 0,10$).

control. Devant y Bach (2004) también registraron aumentos en la producción de leche administrando 84 g malato/d, sin observar cambios en la composición de la leche. Sin embargo, algunos autores no han encontrado diferencias productivas (Kung y col., 1982; Vicini y col., 2003). Devant y Bach (2004) registraron mayor ingesta de concentrado en los animales que recibieron malato, sin ver cambios en el pH ruminal. En consecuencia, estos autores sugieren que el malato puede ser efectivo en la prevención de la acidosis ruminal en vacas lecheras.

5.2.5. Plantas y extractos de plantas

Las plantas sintetizan una amplia variedad de compuestos orgánicos derivados del metabolismo secundario que parecen no tener una función directa, los llamados metabolitos secundarios. Durante años se pensó que estos compuestos eran productos de desecho del metabolismo primario (Balandrin y Klocke, 1985; Curtin y col., 1991), aunque más tarde se ha visto que son responsables del olor, color y sabor de las plantas, y a menudo, de las propiedades antimicrobianas frente a gran variedad de microorganismos (Gershenzon y Croteau, 1991). Debido a sus propiedades antimicrobianas, parecen ser una alternativa natural a los antibióticos para ser usados en producción animal. Estos metabolitos son difíciles de clasificar, aunque generalmente se pueden agrupar en: saponinas, taninos y aceites esenciales (mayoritariamente terpenos y fenilpropanos).

Las saponinas son compuestos vegetales caracterizados desde el punto de vista estructural por presentar una genina policíclica con una estructura esferoidal (típicamente C27) o triptenoide (C30) adherida a una unidad de carbohidrato enlaces glicosídeos y/o ester entre una genina poco polar y restos glucídicos. Su nombre proviene del latín “sapo” que significa jabón, porque se caracterizan por formar espuma en soluciones acuosas. Sin duda, uno de los extractos más estudiados como aditivo alimentario en rumiantes es una saponina (*Yucca shidigera*).

El término tanino proviene del inglés “tanning” que significa “curtido” ya que originalmente esta sustancia se utilizaba para curtir pieles. Estos extractos son polímeros polifenólicos producidos en las plantas, los cuales se pueden clasificar en dos

grupos: taninos hidrolizables (presentes en piel de las plantas y agallas de las plantas) y taninos condensados (presentes en forrajes, especialmente en leguminosas). Algunos estudios han observado efectos beneficiosos de administrar concentraciones medias de taninos condensados en rumiantes, como por ejemplo, disminuir el timpanismo en terneros en pastoreo (Min y col., 2006. Figura 14). Sin embargo, los taninos a concentraciones altas pueden ser tóxicos y/o tener efectos antinutricionales sobre el animal (Barry y Duncan, 1984; Min y col., 2003).

Un aceite esencial es la mezcla de metabolitos secundarios que se obtiene al aislar la fracción volátil de la mayoría de plantas, mediante destilación o extracción con disolventes orgánicos (Gershenzon y Croteau, 1991). Muchos estudios han evidenciado efectos positivos de estos compuestos, como pueden ser propiedades antioxidantes, antisépticas y antimicrobianas. Gran parte de los componentes antimicrobiales de las plantas se localizan en la fracción de los aceites esenciales (Beuchat, 1994; Calsamiglia y col., 2007). Referente a su utilización en la producción de rumiantes, estudios *in vitro* han indicado que el aceite de ajo, el cinamaldehído (componente mayoritario del aceite de canela), el eugenol (componente activo del clavo), la capsaicina (componente activo del pimentón), y el anetol (componente activo del aceite de anís), entre otros, pueden mejorar el perfil fermentativo, incrementando la producción de propionato y reduciendo la de acetato o metano (Calsamiglia y col., 2007).

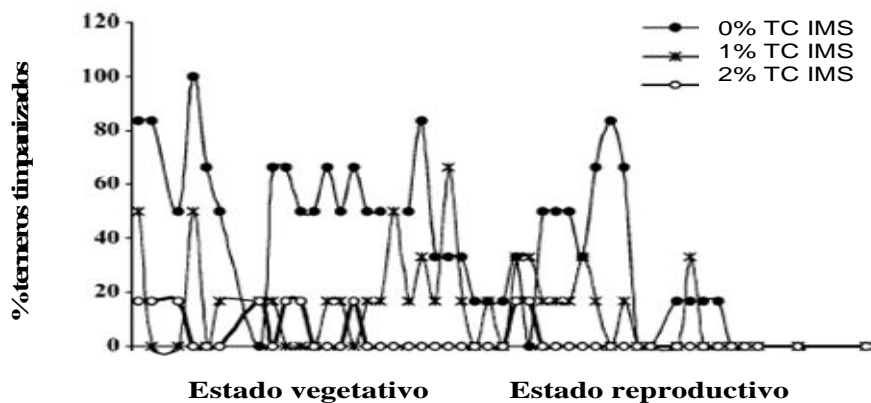


Figura 14. Efecto de los taninos condensados (TC) sobre el timpanismo en terneros que reciben trigo en pastura durante distintos estadios de crecimiento. Fuente: Win y col. (2006).

El principal mecanismo de acción de estos compuestos se centra en la membrana citoplasmática, ya que los hidrocarburos cíclicos (mayoría de terpenos y fenilpropanos) son capaces de interactuar con la bicapa lipídica de las bacterias y desestabilizarla (Sikkema y col., 1994; Griffin y col., 1999). En consecuencia, son más activos frente a bacterias gram positivas que frente a las gram negativas (Smith-Palmer y col., 1998, Chao y Young, 2000), ya que muchos de los componentes de los aceites esenciales son lipofílicos y no pueden atravesar la membrana externa de los organismos gram negativos. Sin embargo, algunas moléculas hidrofóbicas de bajo peso molecular pueden atravesarla lentamente a través de proteínas de membrana (Griffin y col., 1999; Dorman y Deans, 2000), como es el caso del cinamaldehído, timol y carvacrol (Helander y col., 1998). Además, algunas sustancias pueden causar coagulación de componentes citoplasmáticos (Burt, 2004), e interactuar con moléculas activas como es el caso de las enzimas (Juven y col., 1994) o con ácidos nucleicos (Prescott y col., 2004).

Los trabajos publicados en los últimos años han estudiado el efecto de gran cantidad de plantas y sus extractos sobre la fermentación ruminal. La gran complejidad y heterogeneidad de estos compuestos conlleva a una gran variedad en su respuesta (Calsamiglia y col., 2007). La mayoría de los efectos no tienen relación con la acidosis ruminal, y además existen estudios *in vitro* con saponinas de *Y. shidigera* utilizando raciones altas en concentrados con resultados contradictorios. Por un lado, los resultados observados por Wang y col. (1999) en un cultivo mixto de bacterias sugirieron que el extracto de yuca estimulaba las bacterias utilizadoras de almidón, mientras que impedían la actividad de bacterias involucradas en la degradación de la fibra. Al contrario, Wallace y col. (1994) observaron que la adición de 1% (v/v) de *Y. shidigera* en cultivos puros reducían el crecimiento de *S. bovis* sin afectar a *S. ruminantium* (Figura 15). Asimismo, Wang y col. (2000) observaron que la adición de 250 µg de la saponina esteroideal de *Y. shidigera* reducía el crecimiento de *S. bovis*, *Ruminobacter amylophilus* y *Prevotella bryantii*, y estimulaba el de *S. ruminantium*. Por lo tanto, estos últimos estudios apoyan la teoría de que las saponinas pueden prevenir la acidosis ruminal, disminuyendo la principal bacteria productora de ácido láctico y en uno de los casos aumentar una bacteria utilizadora de láctico, previniendo así la acumulación de lactato. Sin embargo, debido a sus propiedades espumantes, la adición de saponinas en la dieta podría favorecer la aparición de timpanismo (Cheeke, 1996).

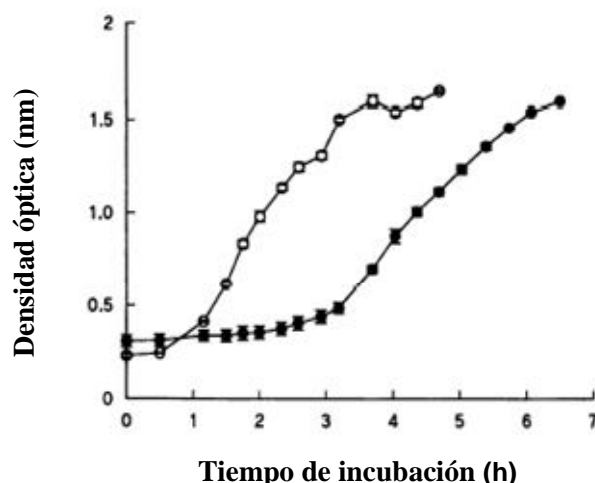


Figura 15. Influencia del extracto de *Yucca shidigera* en el crecimiento de *Streptococcus bovis* en cultivo puro. Símbolos: ○, control; ●, 1% extracto de *Y. shidigera*. Fuente: Wallace y col. (1994).

5.2.6. Prebióticos y probióticos

En primer lugar, es importante diferenciar entre prebiótico y probiótico, ya que a menudo se utilizan estos términos erróneamente. Por un lado, un prebiótico es “un ingrediente no digestible que afecta positivamente al hospedador estimulando el crecimiento y/o la actividad de una o pocas bacterias beneficiosas propias de la flora gastrointestinal del hospedador” (Gibson y Roberfroid, 1995). Además, para que un ingrediente sea clasificado como prebiótico tiene que cumplir los requisitos siguientes: a) no ser hidrolizable ni absorbido en el tracto gastrointestinal superior, b) ser un sustrato selectivo para una o pocas bacterias beneficiosas en el colon, estimulando su crecimiento y/o actividad y c) alterar la microflora del colon hacia una composición más saludable (Collins y Gibson, 1999). Y, por otro lado, un probiótico es “un suplemento alimentario que contiene microorganismos vivos, los cuales pueden mejorar las propiedades de la flora intestinal” (Fuller, 1989). La confusión existe a menudo, por ejemplo, en aquellas mezclas que contienen cultivos de microorganismos en las cuales no se garantiza la supervivencia de los mismos, o que contienen “prebióticos” que sí son degradables, etc., resultando estos productos difíciles de clasificar. Como se puede

observar, estas definiciones tienen su origen claramente en humana y, por lo tanto, sería necesario adaptarlos en producción animal, especialmente en los rumiantes, dónde mayoritariamente el mecanismo de acción de estas sustancia se desarrolla en el tracto gastrointestinal anterior y no en el colon. Por consiguiente, sería de utilidad proponer algún término para englobar a todas esas sustancias. En este apartado de la tesis están incluidos algunos aditivos que desde un punto de vista purista no estarían bien clasificados.

En la mayoría de estudios con prebióticos y probióticos en rumiantes se han observado efectos positivos, como por ejemplo: incrementando la ganancia media diaria (**GMD**) en terneros, aumentando la producción de leche en vacas, mejorando la salud en terneros jóvenes, etc. (Krehbiel y col., 2003). Sin embargo, también existen estudios en los que no se observa ningún efecto (Raeth-Knight y col., 2007). Entre los grupos de sustancias más utilizadas en rumiantes destacan las levaduras, los hongos, y las bacterias utilizadoras y productoras de lactato.

5.2.6.1. Levaduras

En las últimas décadas se han introducido las levaduras como aditivo en la producción de rumiantes. En este apartado se incluyen levaduras vivas, muertas, componentes de su pared, contenidos celulares y medios de cultivo enriquecidos con minerales. Las levaduras son hongos unicelulares que se pueden clasificar en 2 grupos: aerobios estrictos y facultativos, siendo estos últimos los usados como aditivos alimentarios en animales. La especie más utilizada es *Saccharomyces cerevisiae*. Para explicar los mecanismos de acción es necesario distinguir entre levaduras vivas y cultivos de levaduras (no se asegura su viabilidad).

Existen varios trabajos y revisiones acerca de los efectos de la inclusión de levaduras vivas en la ración de rumiantes, y se han descrito varios mecanismos de acción (Newbold y col., 1996; Chaucheyras-Durand y col., 2008). Por un lado, resulta en un incremento en el número total de microorganismos, el cual se explica por un aporte de nutrientes (principalmente malato, además de aminoácidos, vitaminas B, etc.) por parte de las levaduras, y al consumo del oxígeno para su respiración. Este medio más rico en nutrientes y a la vez más anaeróbico, propicia el aumento de bacterias celulolíticas

como *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus albus*, el de bacterias utilizadoras de ácido láctico (Nisbet y Martin, 1991; Newbold y col., 1996, 1998. Figura 16), y el de hongos celulolíticos (*Neocallimastix frontalis*; Chaucheyras y col., 1995). Además, las levaduras disminuyen la concentración de lactato: por un lado, parecen estimular la utilización de lactato por parte de *S. ruminantium* y de *M. elsdenii* (Chaucheyras y col., 1996; Callaway y Martin, 1997) resultando en un aumento de propionato (Lila y col., 2004), y por otro lado, disminuyen la producción de lactato por parte de *S. bovis*, ya que las levaduras compiten con esta bacteria por la glucosa (Chaucheyras y col., 1996). La disminución en la acumulación de ácido láctico incrementa el pH ruminal, favoreciendo aún más el crecimiento de las bacterias celulolíticas y, con ello, la digestión de la fibra, la ingestión de MS y la producción de los animales (Dawson y col., 1990; Yoon y Stern, 1995; Lila y col., 2004). Recientemente, Bach y col. (2007) realizaron un estudio administrando un producto con levaduras vivas a tres vacas lactantes, y observaron un aumento del pH ruminal en los animales tratados, como también una disminución del intervalo entre comidas. En este trabajo los autores sugieren que el cambio en el patron de ingesta podría explicar el aumento del pH observado. Sin embargo, otros estudios con más animales serían necesarios para validar esta hipótesis. La Figura 17 muestra un esquema del modo de acción de las levaduras (Yoon y Stern, 1995).

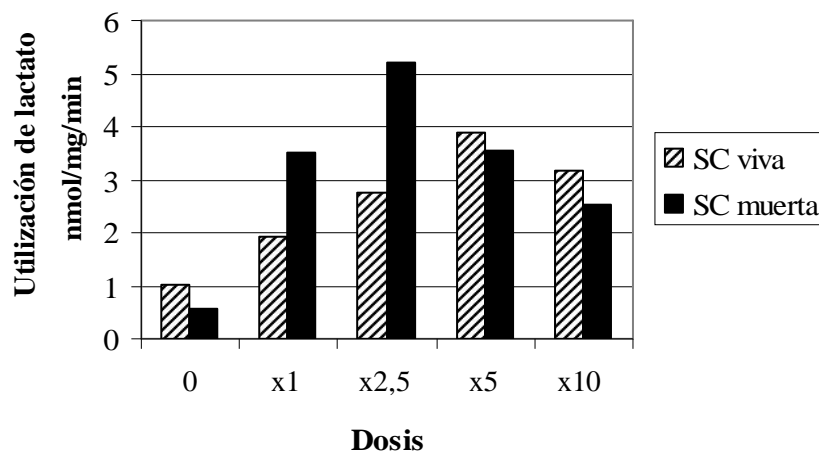


Figura 16. Utilización del lactato por parte de *Selenomonas ruminantium*, comparando cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) con levaduras vivas y muertas. Fuente: Nisbet y Martin (1991).

El mecanismo de acción de los cultivos de levaduras no se basa en los efectos de la levadura como organismo vivo, y es debido a su alto contenido en nutrientes (betaglucanos, nucleótidos, ácidos orgánicos, aminoácidos y/o vitaminas). Por consiguiente, se ha observado que estimulan el crecimiento de bacterias celulolíticas y de bacterias utilizadoras del ácido láctico, con el consiguiente descenso de lactato en el medio (Nisbet y Martin, 1991; Callaway y Martin, 1997).

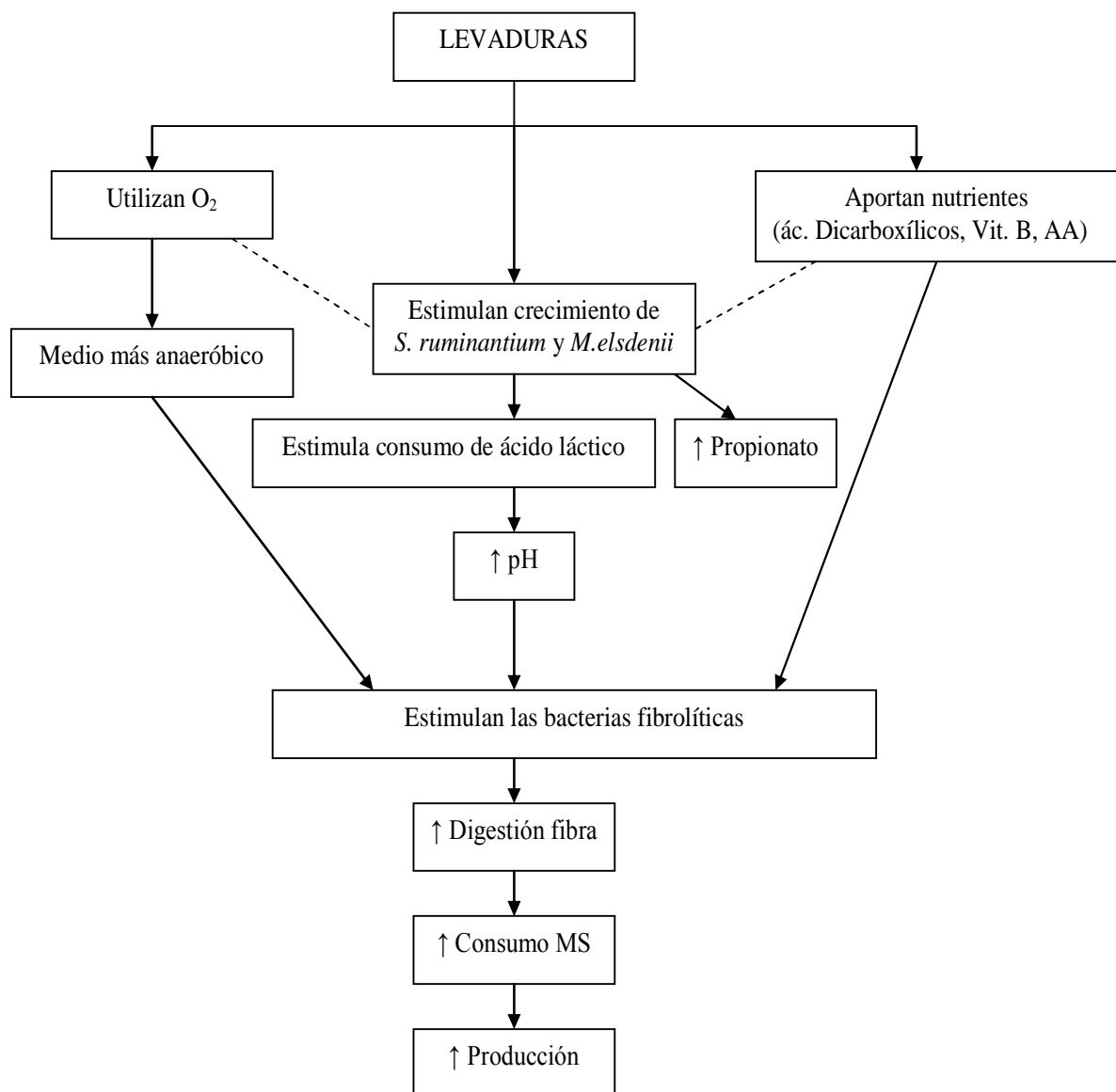


Figura 17. Esquema de los efectos de las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) en el medio ruminal. Fuente: Adaptado de Yoon y Stern (1995).

5.2.6.2. Hongos

En la alimentación para rumiantes se puede usar algunos hongos. En concreto, *Aspergillus oryzae* se encuentra en muchas de las mezclas de “prebióticos-probióticos”. Estos aditivos contienen cierta cantidad del hongo, medio de cultivo y subproductos de la fermentación, sin garantizar la supervivencia de los microorganismos. Su mecanismo de acción consiste en estimular la actividad fibrolítica del rumen, principalmente mediante la estimulación del hongo fibrolítico *N. frontalis* (Welch y col., 1996; Schmidt y col., 2004), ya que este hongo interviene en la “solubilización” de la fibra para hacerla más accesible a las bacterias (Orpin, 1977; Bauchop, 1979; Wood y col., 1986). Algunos autores señalan que al aumentar la digestión de la fibra también se incrementa la producción de AGV. Por ejemplo, Beharka y col. (1991) constataron que la administración de extracto de fermentación de *A. oryzae* a terneras en crecimiento aumentaba la concentración total de AGV a partir de la 4ª semana de edad (Figura 18).

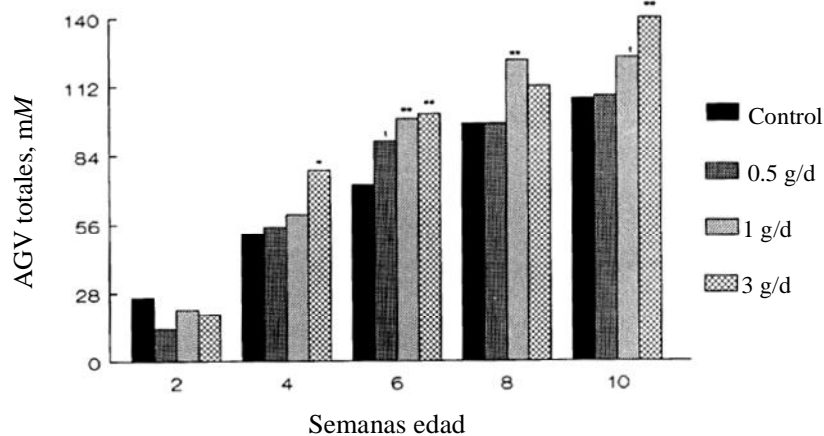


Figura 18. Efectos de la administración de extractos de fermentación de *Aspergillus oryzae* en terneras en crecimiento sobre la producción total de ácidos grasos volátiles (AGV). Fuente: Beharka y col. (1991).

Además, varios estudios en los que se ha administrado *A. oryzae*, se ha observado una estimulación de bacterias utilizadoras de lactato como *S. ruminantium* y/o *M. elsdenii*, debido a su aporte de nutrientes (Nisbet y Martin, 1990; Waldrip y Martin, 1993; Beharka y Nagaraja, 1998. Figura 19). En consecuencia, la administración de este hongo disminuiría la acumulación de lactato y aumentaría el pH ruminal favoreciendo el

crecimiento de las bacterias fibrolíticas, actuando de forma similar que las levaduras (Yoon y Stern, 1995). Sin embargo, pocos estudios han confirmado el incremento de pH ruminal (Beharka y col., 1991).

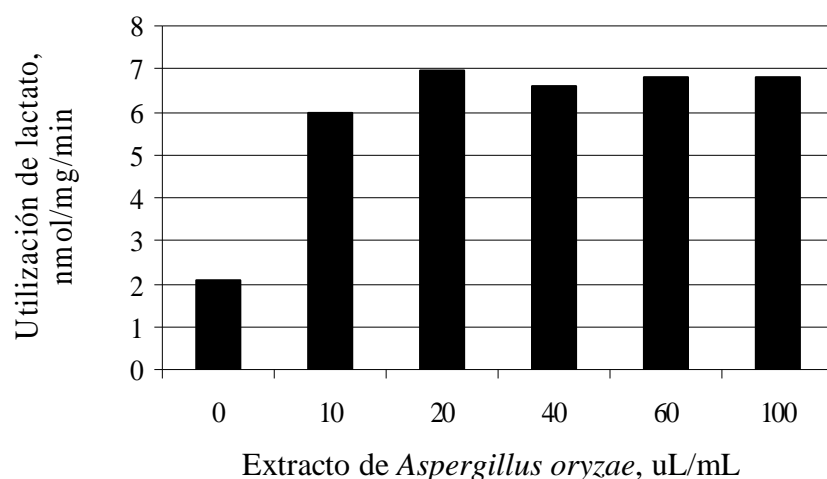


Figura 19. Efecto de *Aspergillus oryzae* sobre la utilización de lactato por parte de *Megasphaera elsdenii*. Fuente: Adaptado de Waldrip y Martin (1993).

5.2.6.3. Bacterias utilizadoras de lactato

En los últimos años, se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro* inoculando bacterias utilizadoras de lactato en líquido ruminal, concretamente de *M. elsdenii* (Kung y Hession, 1995; Klieve y col., 2003). Esta estrategia tiene como objetivo prevenir la acidosis ruminal disminuyendo la acumulación de ácido láctico mediante el aumento de su metabolización por parte de *M. elsdenii*, la principal bacteria utilizadora de lactato (Counotte y col., 1981). Kung y Hession (1995) inocularon *M. elsdenii* en cultivos *in vitro* de líquido ruminal de terneros. Utilizaron sustratos rápidamente fermentables y 3 tratamientos (0, $8,7 \times 10^5$ y $8,7 \times 10^6$ ufc *M. elsdenii*/mL). Estos autores observaron una reducción de la caída del pH y de la concentración de lactato durante la fermentación en los cultivos tratados (Figura 20).

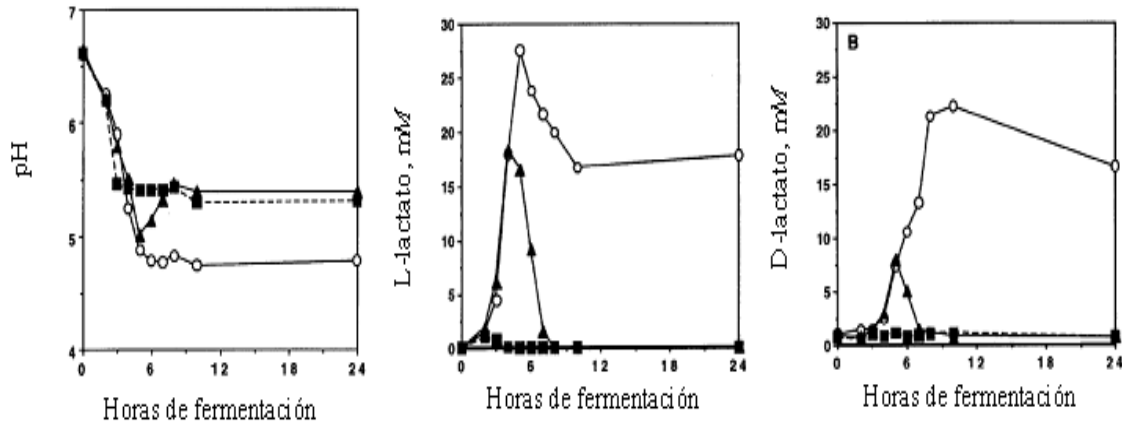


Figura 20. Efecto de la inoculación de *Megasphaera elsdenii* en cultivos ruminales sobre el pH, el D-lactato y el L-lactato (○: cultivo control; ▲: cultivo con *M. elsdenii* $8,7 \times 10^5$ ufc/mL; ■: cultivo con *M. elsdenii* $8,7 \times 10^6$ ufc/mL). Fuente: Kung y Hession (1995).

En 1995 se realizó un estudio *in vivo* inoculando bacterias utilizadoras de lactato en ovejas sometidas a un cambio brusco de dieta concentrada (Wiryawan y Brooker, 1995). Un grupo de animales fueron inoculados previamente en el rumen con 1×10^8 ufc de *S. ruminantium* subsp. *lactilytica* (JDB201), otro grupo con una mezcla de 1×10^8 ufc de *S. ruminantium* subsp. *lactilytica* (JDB201) y de 1×10^8 ufc de *M. elsdenii* (JDB301), y el resto de los animales fueron el grupo control. El grupo control tuvo pH inferiores a 5,0, concentraciones de ácido láctico superiores a 100 mM y síntomas de acidosis evidentes. Los animales inoculados sólo con *S. ruminantium* spp. *lactilytica* estabilizaron el pH entre 6,3 y 6,5 y no se detectó lactato en el rumen hasta las 24 h, mientras que el grupo inoculado con ambas bacterias fue capaz de mantener el pH estable durante 4 días. Asimismo, Klieve y col. (2003) realizaron un estudio con 10 terneros, a la mitad de los cuales se les inoculó *M. elsdenii* YE34 ($5,5 \times 10^{11}$ ufc) y *Butyrivibrio fibrisolvans* YE44 (3×10^{12} ufc). Los animales recibían una dieta forrajera, y el día 7 del experimento se les sometió a un cambio brusco de dieta forrajera a concentrada. El día 8 se realizó la inoculación de las bacterias en el rumen. Los animales no inoculados tardaron entre 5 y 7 días más para conseguir establecer una población de *M. elsdenii* comparable en número con los animales inoculados (Figura 21). La inoculación tiene la ventaja de poder proteger a los animales de la acidosis en el momento de riesgo, por ejemplo, en un cambio brusco de alimentación, pero es poco práctico.

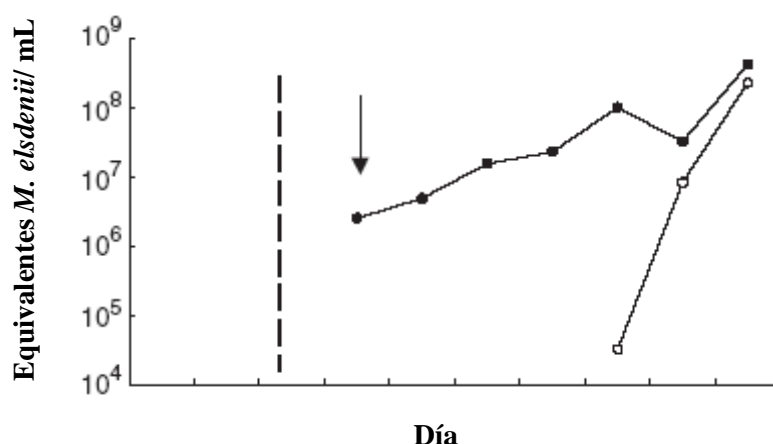


Figura 21. Densidad ruminal de *Megasphaera elsdenii*. Tratamientos: animales inoculados con *M. elsdenii* $5,5 \times 10^{11}$ ufc (●), animales no inoculados (○). La línea discontinua indica el primer día de administración de concentrado. La flecha indica el día de inoculación. Fuente: Klieve y col. (2003).

En consecuencia, la inoculación de bacterias utilizadoras de lactato podría ser una buena alternativa frente a la prevención de la acidosis, aunque son necesarios más estudios para corroborarlo.

5.2.6.3. Bacterias productoras de lactato

Algunas bacterias productoras de ácido láctico se han utilizado como probiótico en rumiantes, y se ha observado que pueden disminuir el riesgo de acidosis ruminal. No obstante, muchos de los estudios realizados han utilizado estas bacterias en combinación con otras sustancias, principalmente levaduras (Ghorbani y col., 2002; Nocek y col., 2002; Nocek y Kautz, 2006) y, por consiguiente, al presentar un efecto confundido no se han considerado en este apartado. Nocek y col. (2000) administraron una mezcla de *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum* a vacas lecheras, y observaron un mayor pH mínimo diario y una menor área debajo de la curva de pH por debajo de 5,5 en los animales inoculados comparando con el control. Aunque todavía no está claro su modo de acción, posiblemente la presencia de más cantidad de bacterias productoras de lactato con el consiguiente aumento de ácido láctico en el medio ruminal, estimulan la adaptación de la microflora ruminal, proliferando las bacterias

utilizadoras de lactato. Sin embargo, Beauchemin y col. (2003) realizaron un estudio administrando *Enterococcus faecium* en terneros de engorde adaptados a una dieta concentrada y, contrariamente a lo esperado, la única diferencia observada fue un menor pH ruminal mínimo en el grupo tratamiento respecto el control (5,03 y 5,15, respectivamente). Estos autores atribuyeron esta falta de resultados en este experimento a la severa acidosis que padecían los animales comparada con la de otros estudios anteriores.

5.2.7. Inmunización

En la última década, han aparecido varios estudios relacionados con la inhibición, mediante vacunación de los animales, de bacterias involucradas en el desarrollo de la acidosis ruminal. Shu y col. (1999) realizaron el primer estudio de inmunización contra *S. bovis* y *Lactobacillus* (principales bacterias productoras de ácido láctico) en terneros Hereford de 1 año de edad. El experimento consistió en vacunar a la mitad de los animales intramuscularmente mediante 5 dosis (de 5 mL cada una) en los días 0, 30, 44, 59 y 73 de la prueba. Los animales permanecieron alimentados con una dieta 100% forrajera hasta el día 90, cuando se produjo el cambio a una dieta con 90% concentrado. Los niveles de anticuerpos (Figura 22) contra *S. bovis* y *Lactobacillus* detectados en suero y saliva fueron muy bajos en todos los animales antes de la inmunización (día 0) y en el grupo control durante todo el experimento. En el grupo de animales inmunizados, la concentración de anticuerpos en suero fue significativamente superior a partir del día 44 y 59 en el caso de *S. bovis* y *Lactobacillus*, respectivamente, llegando a niveles máximos el día 90. Por otro lado, los niveles de los anticuerpos en saliva fueron significativamente superiores desde el día 44 hasta al final del experimento (exceptuando el día 90 y 91 para *S. bovis* y *Lactobacillus*, respectivamente). La concentración de lactato fue significativamente menor en el segundo día del cambio de dieta en el grupo de los animales vacunados comparados con el control (Figura 23). Al mismo tiempo, en el grupo tratamiento se observaron menores recuentos de *S. bovis* (3,69 vs. $5,68 \pm 0,36 \log_{10}$ ufc/mL) y *Lactobacillus* (6,33 vs. $8,23 \pm 0,40 \log_{10}$ ufc/mL) en el rumen en el día 90 y 92, respectivamente, respecto al grupo control.

Gill y col. (2000) realizaron un estudio inmunizando carneros merinos de 2 años contra *S. bovis*. Se utilizaron 20 animales repartidos en 4 grupos: control, inmunizados con

bacteria viva, e inmunizados con bacteria muerta con y sin adyuvante. Los carneros se vacunaron intramuscularmente en los días 0, 28, 42 y 56 del experimento. Los animales recibieron una dieta 100% forrajera hasta el día 62, cuando se produjo el cambio a una dieta concentrada. Los animales inmunizados con bacteria viva presentaron una ingesta de alimento mayor en el día 64, un pH ruminal mayor y una concentración de lactato menor comparando con el grupo control y los grupos de carneros inmunizados con bacteria muerta (Tabla 11). Todos los grupos de animales inmunizados presentaron menor severidad de las diarreas observadas en el periodo posterior al cambio de dieta respecto al grupo control (Figura 24).

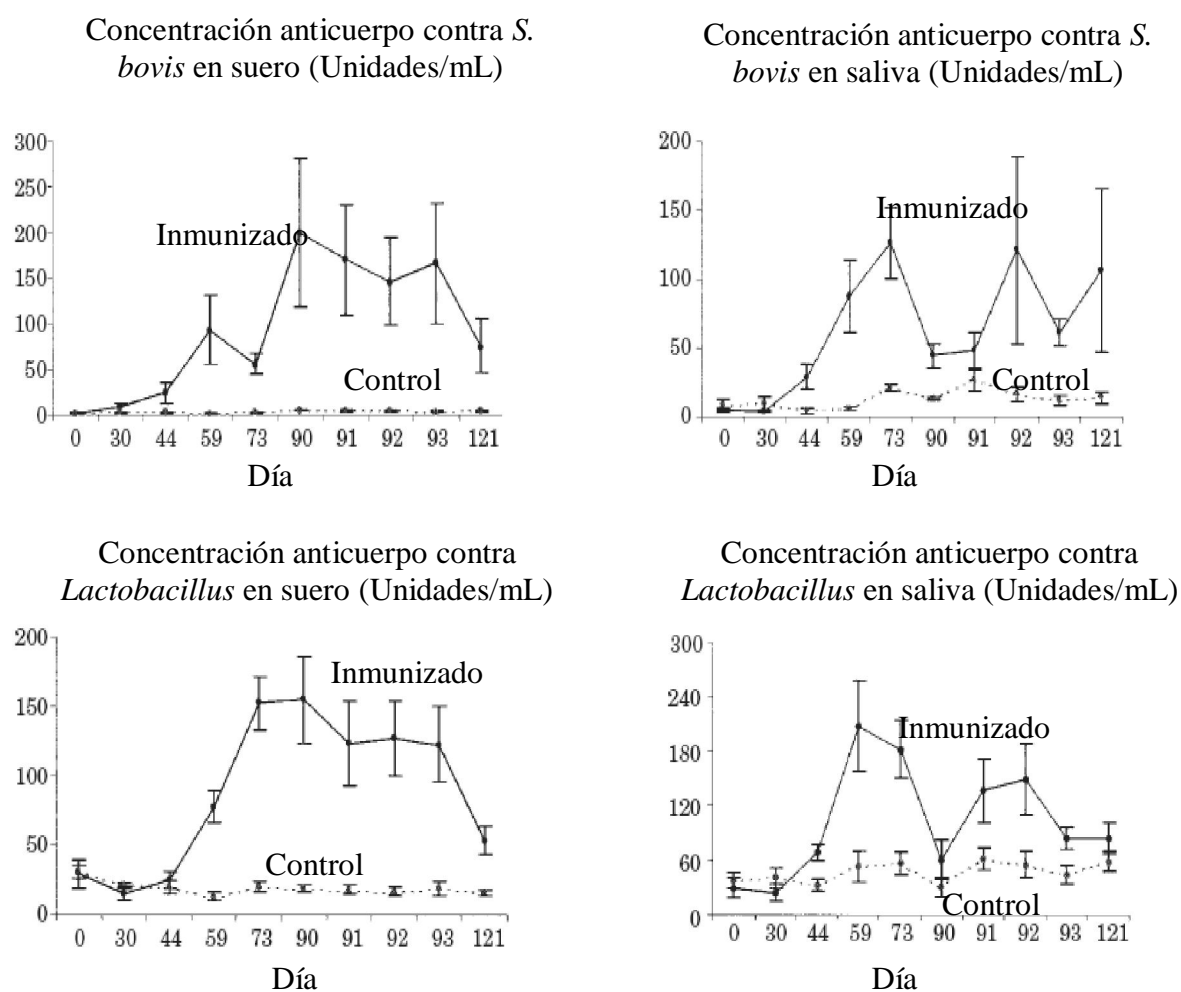


Figura 22. Concentraciones de anticuerpos contra *Streptococcus bovis* y *Lactobacillus* en suero y saliva de terneros inmunizados contra estas bacterias y en animales control. Las barras verticales representan el error estándar de la media. Fuente: Shu y col. (1999).

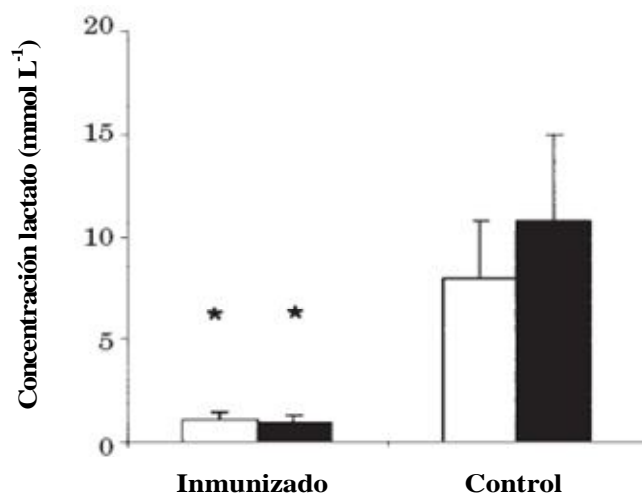


Figura 23. Concentración de lactato 24 h después del cambio de dieta forrajera a concentrada en animales vacunados contra *Streptococcus bovis* y *Lactobacillus* y en animales control. □, L-lactato; ■, D-lactato. Las barras verticales representan el error estándar de la media. * $P < 0,05$. Fuente: Shu y col. (1999).

Tabla 11. Efecto del cambio de dieta forrajera a concentrada sobre el pH y la concentración de lactato en carneros no inmunizados contra *Streptococcus bovis* (Control), inmunizados con bacteria viva y adyuvante (Viva + A), bacteria muerta con adyuvante (Muerta + A), bacteria muerta sin adyuvante (Muerta). Fuente: Gill y col. (2000).

	Día ¹	Control		Viva + A		Muerta + A		Muerta	
		Media	DE ²	Media	DE	Media	DE	Media	DE
pH	2	7,28	0,26	7,22	0,47	7,04	0,30	7,11	0,36
	4	5,02 ^a	0,31	6,22 ^b	0,13	5,38 ^a	0,25	5,09 ^a	0,22
L-Lactato (mmol/L)	2	1,04	1,58	0,98	1,24	ND ³	-	ND	-
	4	15,2 ^a	8,56	2,89 ^b	2,17	ND	-	ND	-

¹Día: Día post-administración de concentrado.

²DE: desviación estándar.

³ND: no determinado.

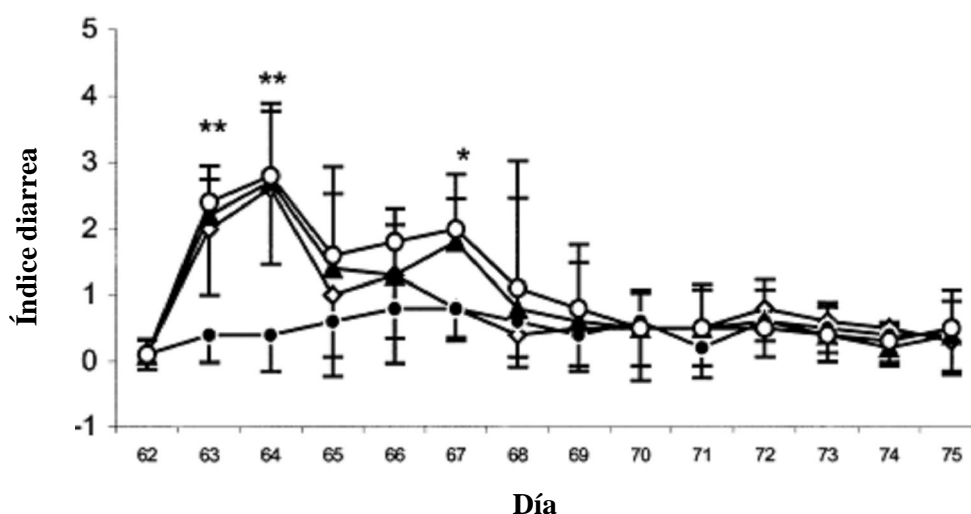


Figura 24. Efecto del cambio de dieta forrajera a concentrada sobre el índice de diarreas en carneros no inmunizados contra *Streptococcus bovis* (—○—), inmunizados con vacuna con bacteria viva y adyuvante (—●—), bacteria muerta con adyuvante (—▽—), bacteria muerta sin adyuvante (—▲—). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (tratamiento vs. control). Fuente: Gill y col. (2000).

En un estudio realizado por Shu y col. (2000) se compararon 2 vías de administración de la vacuna contra *S. bovis* en carneros: intramuscular (**IM**) e intraperitoneal (**IP**). La concentración de anticuerpos en la saliva fue superior en los animales del grupo IM que en los del grupo IP en el día 75 (224 y 103 ± 30 unidades/mL, respectivamente) y 77 (238 y 124 ± 67 unidades/mL, respectivamente). Asimismo, el nivel de ingestión y el pH ruminal fueron superiores en los animales vacunados IM que en los vacunados IP (Figura 25). En consecuencia, los resultados indican mayor respuesta con la vía de administración IM comparada con la IP.

Por lo tanto, los estudios referentes a la vacunación frente bacterias productoras de lactato indican que disminuyen el riesgo de acidosis en rumiantes. Por un lado, aumentan la ingestión y el pH ruminal de los animales y, por otro lado, disminuyen la severidad de diarreas, la acumulación de lactato y el número de bacterias productoras de láctico en el medio ruminal. El mecanismo de acción por el que la inmunización reduce la acidosis láctica probablemente está relacionada con la unión de los anticuerpos con

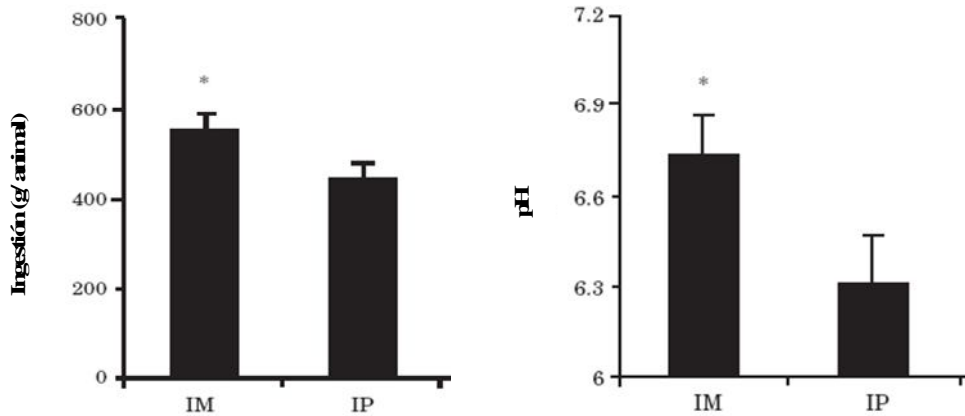


Figura 25. Efecto de la vía de administración de una vacuna contra *Streptococcus bovis* sobre la ingestión diaria y el pH ruminal en carneros (**IM**: intramuscular; **IP**: intraperitoneal). Fuente: Shu y col. (2000).

los microorganismos (Mathison y col., 1984; Gnanasampanthan, 1993), la cual reduce su crecimiento y/o interfiere en sus funciones biológicas críticas. Gnanasampantham (1993) sugirió que era necesario inducir una respuesta de anticuerpos específica en la saliva para controlar los microorganismos ruminales, porque el rumen por si solo tiene muy poca respuesta inmune ya que el epitelio no es glandular y sus paredes son muy queratinizadas (Dobson y col., 1956). Además, la saliva puede aportar una gran cantidad de anticuerpos en el rumen puesto que más del 70% del agua del rumen proviene de la saliva (Church, 1988).

Recientemente, también es posible la inmunización pasiva, que consiste en administrar a los animales un aditivo en la dieta que contiene anticuerpos contra bacterias ruminales involucradas en el proceso de la acidosis ruminal. Estos anticuerpos se obtienen de huevos de gallinas previamente inmunizadas. Las inmunoglobulinas aviares son una buena alternativa para usarlas como aditivo alimentario al ser resistentes al calor, a la digestión ácida y a la proteólisis (Shimizu y col., 1988). DiLorenzo y col. (2006) realizaron una prueba con 17 terneros cruzados alimentados con una dieta alta en concentrado. En primer lugar, evaluaron la administración durante 14 días de varias dosis de una preparación de anticuerpos policlonales contra *S. bovis* (0, 2,5, 5, y 7,5 mL **PAP-Sb**/animal/día). Comparando el recuento de *S. bovis* entre el día 0 y el 14 de administración del producto, sólo se consiguió una reducción significativa con la dosis más elevada. Por otro lado, ninguna de las dosis afectaron al recuento de *Fusobacterium*

necrophorum (Tabla 12). En segundo lugar, se estudió el efecto de la administración durante 29 días de la dosis de 2,5 mL PAP-Sb/animal /día, la cual redujo el número de *S. bovis* (79,2 y 243,3 ± 14,3 millones/mL líquido ruminal) e incrementó el pH ruminal (6,08 y 5,67 ± 0,10) comparando con el control. Los niveles de reducción de *S. bovis* fueron entre el 65% y el 85% con los animales tratados con PAP-Sb, los cuales son niveles similares a los observados administrando antibióticos ionóforos (Coe y col., 1999). Por último, se administró durante 12 días una preparación de anticuerpos policlonales contra *F. necrophorum* (PAP-Fn, 2,5 mL/animal/día) que resultó en una disminución del número de dichas bacterias en el rumen (113,7 y 20,8 ± 0,12 1000x NMP/mL líquido ruminal, control y PAP-Fn, respectivamente), sin afectar el número de *S. bovis* (97,2 y 117,3 ± 3,3 10⁶x NMP/mL líquido ruminal, control y PAP-Fn, respectivamente) ni el pH ruminal (6,18 y 6,35 ± 0,26, control y PAP-Fn, respectivamente). Posteriormente, DiLorenzo y col. (2008) utilizaron las mismas preparaciones de anticuerpos (PAP-Sb y PAP-Fn) en engordes de terneros a lo largo de dos años (226 y 192 terneros, durante el primer y segundo año, respectivamente), para estudiar su efecto sobre los datos productivos, rendimientos de la canal y perfil de fermentación. Los tratamientos consistieron en 2,5 mL de PAP-Sb/animal/día, 2,5 mL de PAP-Fn/animal/día y 2,5 mL de PAP-Sb + 2,5 mL PAP-Fn/animal/día. PAP-Sb mejoró los índices de transformación (CTR = 5,49 y PAP-Sb = 5,41) y disminuyó el número de *S. bovis* en el líquido ruminal (CTR = 24,0 y PAP-Sb = 6,2 millones/mL).

Tabla 12. Efecto de la administración de varias dosis de una preparación de anticuerpos policlonales contra *Streptococcus bovis* (PAP-Sb) sobre los recuentos de *S. bovis* y *Fusobacterium necrophorum* por mL de líquido ruminal en terneros alimentados con dietas altas en concentrado. Fuente: Adaptado de DiLorenzo y col. (2006).

Día	Dosis de PAP-Sb (mL)								ESM
	0		2,5		5		7,5		
	0	14	0	14	0	14	0	14	
<i>S.bovis</i> , millones	363,1 ^{bc}	977,2 ^c	285,1 ^{bc}	97,6 ^{ab}	409,7 ^c	486,9 ^c	751,6 ^c	29,2 ^a	21,8
<i>F.necrophorum</i> , miles	94,4	69,6	84,6	99,4	97,7	17,1	48,9	14,0	27,5

PAP-Fn disminuyó el número de *F. necrophorum* y *S. bovis* en líquido ruminal (CTR = 13,5 y PAP-Fn = 0,4 millones *F. necrophorum*/mL, CTR = 24,0 y PAP-Fn = 5,5 millones *S. bovis*/mL), disminuyó la severidad de los abscesos hepáticos (CTR = 0,267 y PAP-Fn = 0,111) y aumentó el pH ruminal medio (CTR = 5,76 y PAP-Fn = 6,04), sin embargo, disminuyó el rendimiento de la canal (CTR = 62,7% y PAP-Fn = 62,2%).

La administración de preparaciones de anticuerpos policlonales contra *S. bovis* y *F. necrophorum* reducen el recuento de dichas bacterias. *Streptococcus bovis* y *F. necrophorum* están involucradas en el desarrollo de la acidosis ruminal y en la aparición de abscesos hepáticos, respectivamente. Por lo tanto, la reducción de los recuentos de estas bacterias puede ser efectiva en prevenir este trastorno digestivo y paliar sus efectos. Además, un aditivo en la dieta resulta más económico y cómodo de administrar comparado con la vacunación individual y repetida de los animales. Esta alternativa es muy innovadora y atractiva, pero es necesario continuar la investigación en este campo al haber muy pocos estudios realizados al respecto.

6. CONCLUSIONES

En esta introducción se ha constatado la importancia que tiene la acidosis ruminal en el sector del vacuno, tanto desde del punto de vista económico como de bienestar animal. Al mismo tiempo, se ha hecho una revisión de las distintas alternativas existentes para prevenir y/o controlar este trastorno. Y como se ha podido observar, los distintos aditivos tienen diferentes modos de acción, pero ninguno de ellos presenta resultados totalmente satisfactorios. Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar nuevas estrategias efectivas frente a este problema. Por un lado, en primer lugar es necesario profundizar en el estudio del mecanismo de desarrollo de la acidosis ruminal, ya que los trabajos existentes en los que se basan son un poco antiguos. Para ello, las técnicas para el estudio de la microflora gastrointestinal (Anexo 1), que han evolucionado mucho en los últimos años, nos pueden ayudar a progresar en el conocimiento de la acidosis ruminal. Y por otro lado, sería interesante evaluar algunos de los nuevos aditivos alimentarios que están apareciendo en el mercado del vacuno para combatir este problema.

7. OBJETIVOS

Los trabajos que se presentan a continuación pertenecen a una tesis doctoral que tiene como objetivo profundizar en el estudio de la acidosis ruminal, y al mismo tiempo, evaluar nuevas alternativas para prevenir y/o controlar este trastorno.

Con este fin, se estructuró la tesis en 2 fases:

Fase I: Profundización en el estudio de la acidosis ruminal.

- Desarrollo de una técnica que permita la identificación y cuantificación de las principales bacterias involucradas en la acidosis ruminal (Capítulo 2).
- Estudio del efecto de administrar una dieta con altos niveles de carbohidratos no fibrosos en vacas lecheras (Capítulo 3).
- Estudio de los cambios fisiológicos y de fermentación ruminal de terneras en cebo durante una inducción a la acidosis ruminal (Capítulo 4).

Fase II: Evaluación de nuevas estrategias de prevención contra la acidosis ruminal.

- Estudio de los efectos de administrar una preparación de anticuerpos policlonales en terneras en cebo durante una inducción a la acidosis ruminal (Capítulo 4).
- Estudio de los efectos de administrar un inhibidor de la actividad alfa-amilasa en vacas lecheras alimentadas con una dieta con altos niveles de carbohidratos no fibrosos (Capítulo 5).

CAPÍTULO 2

Experimento 1:

Quantification of *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii* in ruminal fluid of cows and heifers by real time PCR technique

Quantification of *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii* in ruminal fluid of cows and heifers by real time PCR technique

ABSTRACT: The objective of this study was to develop a real time PCR assay (Taq Nuclease Assay) to detect and quantify two rumen bacteria involved in ruminal acidosis: *Streptococcus bovis* (a main lactic acid producing bacteria) and *Megasphaera elsdenii* (a main lactic acid utilizing bacteria)(Exp.1). The assay for *S. bovis* and *M. elsdenii* had an efficiency of 88% and 99%, respectively. A comparative study of *S. bovis* and *M. elsdenii* rumen populations was conducted using 4 cows and 4 heifers (696 ± 94 kg and 221 ± 17 kg BW, respectively) (Exp.2), to prove the specificity and variability of the previous techniques. At the same time, some ruminal fermentative parameters were measured in both groups of animals to evaluate the fermentation profile. *Streptococcus bovis* was 145-fold higher in cows than in heifers. *Megasphaera elsdenii* was 13-fold lower in cows than in heifers. The *S. bovis*:*M. elsdenii* ratio appears not to be a good index to be used as an indicator of the risk of acidosis. The variability of the technique was different depending on the factor: day, hour or animal. The coefficients of variation were large and always higher in heifers than in cows (from 45.2% to 156.7% in heifers, and from 25.0% to 94.8% in cows). Although rumen microbiology ecosystem is very complex and multiple interaction occur, the quantification of *S. bovis* and *M. elsdenii* by real time PCR could help to understand the changes occurring during the development of rumen acidosis.

Key words: acidosis, *Megasphaera elsdenii*, real time PCR, rumen, *Streptococcus bovis*.

1. Introduction

Ruminal acidosis is one of the most common nutritional disorders in feedlot and dairy cattle in intensive animal production systems. The increase in the proportion of rapidly fermentable carbohydrates results in the accumulation of volatile fatty acids (VFA) and lactate, increasing the risk of acidosis. The economic impact of ruminal acidosis in the United States has been estimated in 500-1000 million US\$ each year (Stone, 1999). It is apparent that some bacteria involved in the production (*Streptococcus bovis*) and utilization (*Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium*) of lactate play a key role

in the development of ruminal acidosis. For example, the use of specific antibodies against *S. bovis* has been shown to control the population of *S. bovis*, increase ruminal pH and (or) reduce ruminal lactic acid concentration (Shu et al., 1999; Gill et al., 2000; Blanch et al., 2006). The addition of *M. elsdenii* to an in vitro fermentation system as a probiotic resulted in a reduction in lactic acid concentration and the control of pH (Kung and Hession, 1995). Quantitative real time PCR (**qPCR**) may become a powerful and sensitive method for quantitative detection of these microorganisms (Klieve et al., 2003).

This paper reports the development and application of qPCR methods for detecting and quantifying two rumen bacteria involved in ruminal acidosis (*S. bovis* and *M. elsdenii*).

2. Materials and methods

Experiment 1

Culture strains

Streptococcus bovis DSM 20480 and *Megasphaera elsdenii* DSM 20460 were obtained from DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany). *Streptococcus bovis* strain was cultured in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C using DSM medium 53 [DSMZ List of media (<http://www.dsmz.de/media/med053.htm>)]. *Megasphaera elsdenii* was anaerobically cultured in reinforced clostridial medium (Oxoid) at the same temperature. The following bacteria were used as negative controls: *Clostridium sticklandi* (DSM 519), *Peptostreptococcus anaerobius* (DSM 2949), *Clostridium aminophilum* (DSM 10710), *Butyrivibrio fibrisolvens* (DSM 3071), *Ruminococcus albus* (DSM 20455), *Anaerovibrio lipolyticus* (DSM 3074), and *Lactobacillus acidophilus* (DNA was kindly provided by Castillo, M., UAB, Barcelona, Spain). Cultures were grown in the Servei d'Anàlisi i Aplicacions Microbiològiques (UAB, Barcelona, Spain). Bacterial pellets were obtained by centrifugation (4,500 x g, 5 min, 6 °C) and frozen at -20 °C until DNA extraction.

Rumen fluid samples

Rumen fluid was collected from four rumen-cannulated dairy cows and four rumen-cannulated crossbred heifers (see Exp. 2). Ruminant fluid was strained through 2 layers

of cheesecloth and 1.5 mL aliquotes were taken in sterile eppendorfs and frozen at -20 °C until analysis.

DNA extraction and quantification

DNA from bacterial cultures and from rumen fluid samples was extracted by physical disruption using a bead-beating method (Mini-Beater; Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) following the protocol described by Whitford et al. (1998) with some modifications. The bacterial pellet was suspended in 0.6 ml of TE 1X buffer (TRIS-EDTA buffer, Sigma® T9285, St. Louis, MO, USA). Bacterial culture or rumen fluid (0.6 mL) was mixed with an equal volume of pH 8.0 buffered phenol (USB® 75829, Cleveland, OH, USA) in a 2 mL tube with 0.5 g of 0.1 mm glass beads (Biospec Products, Inc., Ref. 11079101, Bartlesville, OK, USA). After adding 40 µL of 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate, Sigma® L4522, St. Louis, MO, USA), the tubes were shaken three times for 2 min on a Mini-Beater (BioSpec Products, Bartlesville, OK). The tubes were placed on ice for 2 min between each bead-beating step, and then spun at 11,600 x g for 5 min in a microfuge. The aqueous phase was transferred to a new tube, extracted with buffered phenol and precipitated with ethanol. Samples were suspended in 100 µL of TE 0.5X and were treated with RNase (2 µL RNase A 10 mg/mL, 1 h at 37 °C) (RNase A, Roche® 0109169000, Sant Cugat del Vallès, Barcelona), re-extracted with phenol, precipitated with ethanol and suspended in 50-200 µL of TE 0.5X. The DNA concentration was measured by spectrophotometry (NanoDrop®ND-1000 Spectrophotometer, Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). The DNA obtained was stored at -20 °C in aliquots of 100 ng/µL (stock).

Oligonucleotide design

Streptococcus bovis specific primers and probe were designed from 16S ribosomal RNA sequence available in the GeneBank database (AY442813), in a similar region as the ones described by Klieve et al. (2003), using the Primer Express™ Software (Applied Biosystems, Warrington, UK). BLAST program at the National Center for Biotechnology Information site (NCBI, <http://www.ncbi.nih.gov/>) and CLUSTALW program at the European Bioinformatics Institute site (EBI, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) were used to ensure specificity of oligonucleotides and probe. The primers and probe sequences used were: forward primer S.bovis F: 5'-GATAGCTAATACCGCATAACAGCATT-3'; reverse primer S.bovis R: 5'-

AACGCAGGTCCATCTACTAGTGAA-3'; and probe *S.bovis* P: 5'-TGCTCCTTTCAAGCAT-3'. The *S.bovis* F and *S. bovis* R primer set amplify a fragment of 84 bp. The Taqman probe selected was end labeled at the 5' end with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM) and at the 3' end with the non fluorescent quencher MGB (minor groove binder). For *M. elsdenii*, a previously published primers specific for a 129 bp fragment of the 16S ribosomal RNA (Ouwkerk et al., 2002) were chosen to accomplish specific amplification of *M. elsdenii*. A *M. elsdenii* specific Taqman MGB probe (Melsprobe: 5'-ACTGGTGTTCTCCTAATA-3') labeled with FAM at the 5' end was designed with Primer ExpressTM Software. The probe was checked for specificity using the BLAST program. Two PCR primers that amplify a consensus fragment of 16S ribosomal RNA were designed (based on the previously published primers EUB008 and EUB338, Hicks et al., 1992) to accomplish universal bacteria amplification. The primers used were: AdaptedEUB008 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGA-3') and AdaptedEUB338 (5'-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'). A fragment of 355 bp was amplified when universal bacteria primers were used in *S. bovis*. All primers were purchased from Isogen Life Science, S.L. (Barcelona, Spain) and Taqman MGB probes from Applied Biosystems (Warrington, UK).

Conventional PCR

PCR were performed at a final volume of 20 μ L. Each reaction mixture contained 1x AmpliTaq Gold buffer (Applied Biosystems), 2.5 mM MgCl₂; 250 mM dNTPs (each), 300 μ M primers (each), 1 U of AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), and 2 μ L of extracted DNA (10 or 50 ng/ μ L). The reaction mixtures were treated according to the following protocol: 94 °C for 10 min, followed by 40 cycles consisting of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min.

Real-time PCR conditions

All samples were run in triplicate for standard curve points or in duplicate for ruminal samples in a 20 μ L reaction volume containing 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), primers at a final concentration of 900 nM each, 250 nM probe, and 100 ng of genomic DNA (5 μ L of ruminal fluid samples at 20 ng/ μ L). The PCR was run in the ABI PRISM[®] 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) using optical grade 96 well-plates using the following amplification

parameters: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, and 40 cycles of 15s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Reactions without DNA were always used as negative controls.

Experiment 2

Animals and Housing

Cows. Rumen fluid samples were collected from four fistulated lactating Holstein cows (average BW of 696 ± 94 kg) at the IRTA experimental farm (Monells, Spain) managed under an intensive production system. The diet consisted of a partial mixed ration (**PMR**) ad libitum and 3 kg/d of concentrate during milking. The PMR consisted (DM basis) of ryegrass silage (60.0%), corn grain (13.1%), alfalfa hay (9.1%), corn gluten feed (5.7%), whole cottonseed (5.2%), soybean meal (3.7%), citrus pulp (2.6%), calcium carbonate (0.23%), salt (0.21%), dicalcium phosphate (0.05%) and micromineral-vitamin premix (0,05%; 4 kg DM of the vitamin and mineral mixture contained 35 millions IU vitamin A, 3 millions IU vitamin D₃, 10g vitamin E (α -tocopherol), 300g sulfur, 50 g zinc, 10 g iron, 250 g magnesium, 40 g manganese, 5 g cooper, 0.4 g cobalt, 1.5 g iodine and 0.2 g selenium) (15.6% CP, 4.9% EE, 35.4% NDF, 20.7% ADF, 0.4% absorbable calcium and 0.3% absorbable phosphorous, DM basis). The concentrate consisted (DM basis) of corn grain (29.6%), soybean meal (29.6%), corn gluten feed (16.5%), distillers dried grains (9.9%), soybean hulls (6.6%), barley (3.3%), molasses (2.0%), sodium bicarbonate (1.6%), salt (0.66%) and magnesium oxide (0.33%) (25.8% CP, 2.9% EE, 21.7% NDF, 11.2% ADF, 0.2% absorbable calcium and 0.4% absorbable phosphorous, DM basis) formulated to meet the requirements of NRC 2001.

Heifers. Rumen fluid samples were collected from four crossbred heifers (average BW of 221 ± 17 kg) fitted with a 1 cm i.d. plastic ruminal trocars (Divasa Farmavic SA, Vic, Spain). Heifers were individually housed in tie-stalls at the Unitat de Granges i Camps Experimentals of the Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Spain). The diet was formulated with a forage to concentrate ratio close to 10:90. Barley straw was the forage source, and the concentrate consisted (DM basis) of ground barley grain (31.6%), ground corn grain (28.9%), soybean meal (12.3%), soybean hulls (7.5%), mandioca (6.5%), corn gluten feed 20% (6.5%), sunflower (4.0%), calcium carbonate (0.7%), sodium bicarbonate (0.5%), dicalcium phosphate (0.5%), sodium chloride (0.5%) and a vitamin and mineral mixture (0,5%; 1 kg DM of the vitamin and mineral mixture

contained 1,5612 K IU vitamin A; 150 K IU vitamin D; 2,500 mg vitamin E; 3,500 mg zinc; 2,000 mg iron; 400 mg manganese; 250 mg cooper; 50 mg cobalt; 38 mg iodine and 25 mg selenium). The diet (91% DM, 15.7% CP, 22.3% NDF, and 11.7% ADF, DM basis) was designed to meet or exceed nutrient recommendations of a 300 kg BW Holstein heifers with an ADG of 0.89 kg/d (NRC, 1996).

Sampling and Analyses

During five consecutive days, samples of whole ruminal contents were collected at 0, 4, 8 and 12 h after the morning feeding. Rumen pH was measured immediately with a portable pH-meter (model 507, Crison Instruments SA, Alella, Spain). Ruminal fluid was strained through 2 layers of cheesecloth and 3 sub-samples of filtrate were taken for VFA, ammonia N and qPCR analyses.

Volatile Fatty Acids. Total and individual VFA were prepared as described by Jouany (1982) and analyzed by gas chromatography: 1 mL of a solution made up of 0.2% solution of mercuric chloride, 0.2% of 4-methylvaleric acid as an internal standard, and 2% ortophosphoric acid, was added to 4 mL of filtered rumen fluid and frozen at -20 °C. Samples were centrifugated at 15,000 x g for 15 min at 7 °C, and the supernatant was analyzed by gas chromatography (model 6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using polyethylene glycol nitroterephthalic acid-treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., Buckinghamshire, UK) at 275 °C in the injector and 29.9 mL/min gas flow rate.

Ammonia N. Rumen ammonia N concentration was analyzed as described by Chaney and Marbach (1962): 4 mL sample of filtered rumen fluid was acidified with 4 mL of 0.2 N HCl and frozen at -20 °C. Samples were centrifuged at 15,000 x g for 15 min, and the supernatant was analyzed by spectrophotometry (Libra S21, Biochrom Analytical Instruments, Cambridge, UK).

Real-Time PCR for quantification of Streptococcus bovis and Megasphaera elsdenii. The rumen fluid samples were aliquoted in sterile eppendorfs of 1.5 mL and frozen at -20 °C. The protocol for DNA extraction, primers, probes and operating conditions were the same described in Exp. 1.

Statistical analyses

The results of the comparative study between cows and heifers were performed using the PROC MIXED procedure of SAS version 8.2 (SAS Inst. Inc., Cary, NC) for repeated measures (Littell et al., 1998). The model contained the group (cows or heifers), hour, day, and the interactions group*hour and group*day. The covariable structure with the minimum BIC was chosen for each variable.

The variability of the technique was analyzed using the PROC TABULATE of SAS version 8.2 (SAS Inst. Inc., Cary, NC) to obtain the coefficients of variation.

3. Results and discussion

Experiment 1

Primer specificity

The primer-probe combination for *S. bovis* did not amplify any of the eight other ruminal bacterial species tested by qPCR, and only amplified *S. bovis* DNA, indicating that it was specific (Table 1), although a BLAST search of *S. bovis* primers and probe against the general database showed a high homology with some Streptococci subgroups (*S. infantarius*, *S. luteciae* and *S. lutetiensis*). However, this should not create a great problem because only *S. bovis* (*S. equinus*) and *S. gallolyticus* (*S. caprinus*), which are closely related, are commonly isolated from the rumen (Brooker et al., 1994; Osawa et al., 1995).

Standard curves with DNA of pure cultures: limit of detection and PCR efficiency

In order to construct a calibration curve and to determine the PCR efficiency and sensibility of the *S. bovis* and *M. elsdenii* specific qPCR assays, serial dilutions (1/10) of DNA prepared from bacterial pure cultures were used. Linear range of quantification was from 10^{-1} to 10^4 pg of specific DNA in both cases. Slopes of -3.636 and -3.333 for *S. bovis* and *M. elsdenii*, respectively, were obtained (Figure 1). Regression coefficient was of 0.999 in both cases. The PCR efficiency was 88% for *S. bovis* and 99% for *M. elsdenii*, calculated as described Ginzinger (2002). The Taqman probe designed in this study for the qPCR of *M. elsdenii* had an improved efficiency compared with that of Ouwerkerk et al. (2002).

Standard curves with ruminal fluid DNA

Serial dilutions (1/10) of ruminal fluid DNA were used to construct calibration curves to check for similar PCR efficiencies to the standard curves of the pure cultures. Ruminal fluid had the same pattern in qPCR for *S. bovis* and *M. elsdenii*, with a slope = -3.68 and a $R^2 = 0.99$ in both cases (Figures 2).

Experiment 2

Comparative study between cows and heifers

The primary objective of this study was the application of the qPCR in ruminal fluid samples of cows and heifers, and to determine the coefficients of variation of the technique. But at the same time, a comparative study of the fermentation profile was conducted to assure that animals had a normal fermentation.

pH, ammonia N, and total and individual VFA concentrations of rumen fluid. Ruminal pH was not different between cows and heifers and averaged 6.26 ± 0.305 (Table 2). Differences ($P < 0.01$) were detected for postprandial pH evolution but interaction was not significant (data not shown). Although heifers and cows were fed different forage to concentrate ratios, 10:90 and 50:50, respectively, they had a similar pH and pH evolution. Dairy cows are usually fed with higher forage and fiber diets compared with beef feedlot cattle, and have a higher dry matter intake which results in a higher total consumption of non-fiber carbohydrates (NFC) compared to heifers. In the present report, the dry matter intake (5.78 and 18.0 kg/d, respectively) and total consumption of NFC (3.12 kg and 6.54 kg, respectively) of heifers was lower ($P < 0.01$) than cows. Oetzel (2003a) observed similar ruminal pH values in feedlot steers and lactating dairy cows when cattle consumed similar total amounts of NFC. Moreover, other studies recorded similar pH in heifers fed high concentrate diets (Devant et al., 2000; Rotger et al., 2005). Another hypothesis for the lack of effect of the type of diet on ruminal pH was suggested by Beauchemin et al. (2003) who argued that the risk of acidosis in steers decreased as time progressed after the transition from a high-forage into a high-concentrate diet, because animals adapt to the high-grain diet. In the present study, heifers were fed the 10:90 forage:concentrate diet since weaning (about 3 months of age) and, therefore, they were well adapted to the diet.

Ammonia N concentration was higher ($P < 0.01$) in cows than in heifers during all day and averaged 10.7 ± 0.701 and 3.85 ± 0.701 mg/100 mL, respectively (Table 2), which was expected due to the higher total CP content in the cow's diet. Ammonia N is the result of protein degradation and ammonia utilization by bacteria. The high-concentrate diet had lower protein and higher NFC contents compared to high-forage diet, which results in lower production and higher utilization of ammonia N by bacteria. In addition, protein degradation is lower in high-concentrate diets than in high-forage diets (Devant et al., 2000; Rotger et al., 2006; Calsamiglia et al., 2008). Other studies also reported low ammonia N concentrations in heifers fed 10:90 forage to concentrate diets (Devant et al., 2000; Rotger et al., 2005).

Total and individual VFA are shown in Table 2. Total VFA (average of 129.6 ± 10.6 mM) and branched-chained VFA (average of 2.47 ± 0.202 mM) concentrations were not affected by diet, nor was the molar proportion of butyrate. In contrast, acetate proportion was higher in cows than in heifers (61.6 ± 1.52 and 50.9 ± 2.10 %, respectively), and propionate proportion was lower in cows than in heifers (22.6 ± 2.23 and 35.6 ± 2.23 %, respectively). Therefore, the acetate:propionate ratio was also higher in cows than in heifers. The acetate and propionate proportions depend on pH and substrate of fermentation. Because ruminal pH was the same in both animals, differences had to be attributed to a diet effect. Calsamiglia et al. (2008) observed that acetate concentration decreased with decreasing pH, and propionate concentration increased with decrease of pH, but acetate concentration was higher and propionate concentration was lower in the 60:40 diets versus 10:90 diets when pH was maintained similar in both diets. The statistical analysis revealed that diet explained 45% of propionate variation.

Quantification of Streptococcus bovis and Megasphaera elsdenii of rumen fluid by quantitative real time PCR. Although some qPCR studies have quantified *S. bovis* in cows (Tajima et al., 2001) and steers (Klieve et al., 2003), and *M. elsdenii* in steers (Ouwkerk et al., 2002; Klieve et al., 2003), this is the first study that compares the quantification of *S. bovis* and *M. elsdenii* between cows and heifers by a qPCR assay. The comparison among studies is difficult because they did not use the same

quantification units: Tajima et al. (2001) used millimoles of 16S rDNA per milligram of total rumen DNA, Ouwerkerk et al. (2002) and Klieve et al. (2003) used cell equivalents per millilitre of ruminal fluid, and in the present study we used pg of 16S rDNA per 100 ng of total rumen DNA. Besides, animals were fed with different types of diets. Other studies enumerated these bacteria, but they did not use qPCR (Russell et al., 1981; Krause et al., 2003).

The quantification of *S. bovis*, *M. elsdenii* and its ratio are shown in Table 3. The quantity of the lactic acid producing bacteria *S. bovis* was 145-fold higher in cows than in heifers (average of 284.7 ± 21.7 and 1.97 ± 21.7 pg *S. bovis* DNA/100 ng total DNA, respectively), and agree with Krause et al. (2003), who reported that *S. bovis* was the dominant specie in animals fed a high-forage diet compared with animals fed a high-grain diet (90% and 40% of total bacteria, respectively). Therefore, the higher level of *S. bovis* in cows in our study could be attributed to the composition of the diet (60% ryegrass silage in PMR). Weinberg et al. (2004) indicated that lactic acid bacteria could pass from silage samples into the rumen fluid and survive there. However, it is unlikely that this would result in a 145-fold increase in *S. bovis*. Tajima et al. (2000, 2001) also studied transitional changes of the ruminal bacterial community structure by cloning and qPCR in cows during the transition from a roughage to a high-grain diet. They observed that the absolute numbers of *S. bovis* seem to be low during all the study with the exception of the 3rd day after the switch to high-grain diet, where there was a 67-fold increase of *S. bovis*. However, on the 28th day of the switch the quantification of *S. bovis* was as low as in the beginning of the trial. In contrast, Goad et al. (1998) compared two groups of steers, one adapted to an 80% alfalfa hay diet and the other adapted to a mostly corn grain diet. They observed that *S. bovis* counts were higher in grain-adapted steers than in hay-adapted steers (158.2×10^4 vs 20.1×10^4).

Streptococcus bovis is a gram positive bacterium with a strong amylolytic activity. Initially, we expected that the contribution of *S. bovis* would be higher in animals fed the high-concentrate diet compared with animals fed the high-forage diet. However, the few papers where *S. bovis* was quantified agree with our results (Krause et al., 2003; Tajima et al., 2000 and 2001). It is likely that the idea that *S. bovis* should be in larger amounts in high-concentrate diets is due to the fact that the majority of studies were

related to the transition period from high-forage to high-concentrate diets instead of adapted animals. During the transition period from forage to concentrate diet, most authors reported an initial increase in amylolytic bacteria as *S. bovis* (Nocek, 1997; Goad et al., 1998; Owens et al., 1998; Tajima, 2001) and, at the same time, a gradual increase of lactate-utilizing bacteria (*M. elsdenii* and *S. ruminantium*) (Dehority and Orpin, 1988; Goad et al., 1998; Tajima et al., 2000). As ruminal pH dropped, *Lactobacillus* counts increased and *S. bovis* counts decreased because of a more favourable acid environment for lactobacilli (Nocek, 1997; Goad et al., 1998). An alternative explanation was provided by Krause et al. (2003), who demonstrated that the diversity of microbial populations in the high-fiber diet was always lower as a consequence of the dominance of *S. bovis*. In contrast, the higher microbial diversity in the high-grain diets resulted from the decline in *S. bovis*. These authors concluded that microbial changes that occur during the transition period were due to competition among bacteria.

The quantification of the lactic acid-utilizing bacteria *M. elsdenii* was 13-fold lower in cows than in heifers, although differences were not significant due to the high SEM (average of 4.04 ± 25.4 and 52.7 ± 25.4 pg *M. elsdenii* DNA/100 ng total DNA, respectively). Goad et al. (1998) observed that grain-adapted steers tended to have higher lactate-utilizing bacterial (as *M. elsdenii*) counts than hay-adapted steers. Moreover, Krause et al. (2003) observed that *M. elsdenii* was detected in animals fed a high-grain diet (12% of *M. elsdenii*) but not in animals fed a high-forage diet (0% of *M. elsdenii*). Ouwwerkerk et al. (2002) were not able to detect *M. elsdenii* in the rumen content from pasture-fed steers by qPCR. These observations agree with our results.

The *S. bovis* to *M. elsdenii* ratio was 49-fold higher in cows than in heifers (average of 68.4 ± 7.66 and 1.33 ± 7.66 , respectively). In the present study, we hypothesized that this ratio could serve as an index to evaluate the risk of acidosis, as the lactobacilli:enterococci ratio developed for monogastric animals as a health index (Castillo et al., 2005). The *S. bovis* to *M. elsdenii* ratio could estimate the risk of acidosis because relates lactate producers and users. Therefore, as the ratio increases there are more producers than user, and the risk of acidosis increases. However, our results suggest that this ratio was not a good index for the evaluation of the risk of acidosis, because in spite of observing different ratios between heifers and cows (1.33

and 68.4 ± 7.66 , respectively), their pH was similar (averaged 6.26 ± 0.305). Further research inducing acidosis is required to confirm the potential use of this index.

In general, there was no effect in the quantity of bacteria among hours post-feeding. Nevertheless, *S. bovis* decreased from 0h to 12h after feeding in cows (from 373.5 to 216.4 pg *Sb* DNA/100 ng total DNA). This decrease could be the result of the balance between bacterial growth and the dilution of ruminal contents with feed and water. Leedle et al. (1982) studied diurnal variation in bacterial numbers in ruminal contents of steers fed low or high-forage diets. They observed that, regardless of diet, total bacterial counts remained fairly constant throughout the day. The number of viable bacteria declined 40 to 60% after feeding and then increased to a maximum at 16h after feeding.

Coefficient of variation of the technique among days, hours and animals. The maximum coefficient of variation between qPCR replicates that was accepted in this study was 2%. The coefficients of variation of the technique in each group of animals (heifers and cows) were different depending on the factor: day, hour or animal (Table 4). In heifers, the coefficients of variation of qPCR of *S. bovis*, *M. elsdenii* and its ratio followed the same pattern: the highest factor was “ANIMAL”, followed by “DAY” and “HOUR”. In cows, the factor with the highest variation was “DAY”, followed by “HOUR” and “ANIMAL”. These coefficients of variation were very high, from 45.2% to 156.7% in heifers and from 25.0% to 94.8% in cows. The coefficients of variation of heifers were always higher than those of cows. The variation observed in other measures that are routinely used in ruminal fermentation studies are smaller for VFA (from 2.42% to 13.1% in the proportion of acetic acid, from 10.6% to 38.4% in total VFA concentration) and within the same range for ammonia N (from 28.3% to 86.9%) (Table 5), but they have been useful to study the profile of fermentation. Therefore, and in spite of the variation observed, qPCR of *S. bovis* and *M. elsdenii* could be useful for the study of ruminal fermentation.

The coefficients of variation observed in this research should be useful when designing the sampling protocol to be used when qPCR methods are applied. The factor that had the lowest variability was “HOUR”, therefore sampling once a day or pooling samples from several hours could be enough. These results also suggest that in heifer studies, the

number of animals is more important than the number of days, and the contrary is true for cows. However, more studies are necessary to confirm these results in in vivo and in vitro assays used in our laboratory (dual flow continuous culture, Tilley and Terry, gas production).

4. Implications

The assay developed in this study provides a tool for quantifying main bacteria involved in ruminal acidosis, *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii*, therefore, it could allow to advance in the knowledge of ruminal acidosis. Moreover, the comparative study demonstrated a large individual variation among animals, which requires that trials use a larger number of animals.

Table 1. Specificity of the primer-probe combinations (10 ng of each pure culture DNA).

Microorganism	Strain	Primer-probe combination	
		<i>S. bovis</i> Ct	<i>M. elsdenii</i> Ct
<i>Streptococcus bovis</i>	DSM 20480	18.9	-
<i>Megasphaera elsdenii</i>	DSM 20460	-	17.6
<i>Clostridium aminophilum</i>	DSM 10710	-	-
<i>Clostridium sticklandi</i>	DSM 519	-	-
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	DSM 2949	-	-
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	DSM 3071	-	-
<i>Ruminococcus albus</i>	DSM 20455	-	-
<i>Anaerovibrio lipolyticus</i>	DSM 3074	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CECT 903NT	-	-

Table 2. Effect of the type of animal (heifers vs cows) on pH, ammonia N (NH₃N) and volatile fatty acids (VFA).

	Heifers	Cows	SEM ¹	P - value ²
Observations, n	12	12		
pH				
0	6.78	6.61	0.325	NS
4	6.27	6.30	0.325	NS
8	6.03	6.07	0.325	NS
12	6.05	6.00	0.325	NS
Average	6.28	6.24	0.305	NS
Observations, n	12	12		
NH ₃ N, mg/100mL ³				
0	6.82	11.1	1.03	*
4	3.21	10.7	1.04	**
8	3.26	9.8	1.03	**
12	2.10	11.6	1.04	**
Average	3.85	10.7	0.701	**
Observations, n	12	12		
Total VFA, mM ³				
0	94.0	117.6	14.6	NS
4	138.4	120.0	15.2	NS
8	149.5	120.1	14.6	NS
12	167.1	130.2	15.2	NS
Average	137.2	122.0	10.6	NS
Observations, n	12	12		
Acetate, mol/100 mol ³				
0	52.6	62.6	2.14	**
4	52.2	61.6	2.15	**
8	50.6	61.8	2.14	**
12	48.1	60.6	2.15	**
Average	50.9	61.6	2.10	*
Observations, n	12	12		
Propionate, mol/100 mol ³				
0	32.1	22.1	2.27	**
4	36.0	22.6	2.28	**
8	36.2	22.4	2.27	**

Real time PCR of rumen bacteria involved in acidosis

12	38.2	23.3	2.28	**
Average	35.6	22.6	2.23	**
Observations, n	12	12		
Acetate to propionate ratio				
0	1.71	2.86	0.157	**
4	1.53	2.73	0.158	**
8	1.50	2.78	0.157	**
12	1.31	2.61	0.158	**
Average	1.51	2.75	0.153	**
Observations, n	12	12		
Butyrate, mol/100 mol ³				
0	9.63	11.3	1.16	NS
4	8.75	12.7	1.15	NS
8	9.42	11.9	1.16	NS
12	10.0	12.6	1.15	NS
Average	9.46	12.1	1.11	NS
Observations, n	12	12		
Branch-chained VFA, mM				
0	2.77	2.65	0.221	NS
4	2.49	2.45	0.230	NS
8	2.44	2.43	0.221	NS
12	2.21	2.25	0.230	NS
Average	2.48	2.45	0.202	NS
Observations, n	12	12		
Valerate, mol/100 mol ³				
0	2.25	1.45	0.376	NS
4	1.81	1.68	0.376	NS
8	1.86	1.54	0.376	NS
12	1.84	1.66	0.376	NS
Average	1.94	1.58	0.374	NS

¹ SEM = standard error of the means.

² NS = $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

³ Type*hour interaction ($P < 0.05$).

Table 3. Effect of the type of animal (heifers vs cows) on quantification of *Streptococcus bovis*, *Megasphaera elsdenii* and their ratio.

	Heifers	Cows	SEM ¹	P - value ²
Observations, n	20	20		
<i>Megasphaera elsdenii</i> , pg/100 ng total DNA				
0	60.9	4.08	27.7	NS
4	48.2	4.59	27.7	NS
8	44.1	3.76	27.7	NS
12	57.5	3.72	27.7	NS
Average	52.7	4.04	25.4	NS
SEM	39.1	0.618		
P - value	NS	NS		
Observations, n	20	20		
<i>Streptococcus bovis</i> , pg/100 ng total DNA ³				
0	1.31	373.5	27.9	**
4	1.22	318.0	27.9	**
8	1.07	230.8	27.9	**
12	4.27	216.4	27.9	**
Average	1.97	284.7	21.7	**
SEM	2.26	39.4		
P - value	NS	*		
Observations, n	20	20		
<i>S. bovis</i> to <i>M. elsdenii</i> ratio ³				
0	0.429	86.0	8.74	**
4	1.84	74.7	8.74	**
8	1.14	58.7	8.74	**
12	1.89	54.3	8.74	**
Average	1.33	68.4	7.66	**
SEM	0.830	12.3		
P - value	NS	*		

¹ SEM = standard error of the means.

² NS = $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

³ type*hour interaction ($P < 0.05$).

Table 4. Coefficients of variation (%) of real-time PCR of *Streptococcus bovis*, *Megasphaera elsdenii*, and their ratio.

		Heifers			Cows		
		Day	Hour	Animal	Day	Hour	Animal
<i>M. elsdenii</i>	Mean	79.6	45.2	156.7	37.1	26.6	34.6
	Interval	31.1-171.1	11.3-92.9	114.6-199.5	17.5-62.0	8.2-55.8	12.8-66.4
<i>S. bovis</i>	Mean	96.6	70.1	138.2	94.8	34.5	25.0
	Interval	60.7-157.2	16.9-166.3	69.1-193.1	68.0-117.5	14.0-68.5	6.74-43.7
<i>S. bovis</i> to <i>M. elsdenii</i> ratio	Mean	83.1	67.9	110.7	85.6	37.4	37.2
	Interval	20.0-164.6	32.5-166.5	7.96-172.0	54.9-114.7	20.3-75.0	12.6-53.7

Table 5. Coefficients of variation (%) of the determination of total volatile fatty acids (VFA, mM), acetic acid (mol/100 mol) and ammonia N (mg/100 mL).

		Heifers			Cows		
		Day	Hour	Animal	Day	Hour	Animal
Total VFA	Mean	15.0	22.2	38.4	10.6	14.6	13.8
	Interval	2.16-52.0	1.75-51.0	22.3-49.8	1.53-19.6	5.92-28.1	7.24-24.7
Acetic acid	Mean	5.58	5.95	13.1	2.69	2.42	2.73
	Interval	1.80-11.7	3.99-9.82	9.27-14.6	0.92-6.28	0.58-4.43	2.20-4.27
Ammonia N	Mean	78.0	86.9	82.3	28.3	29.3	29.9
	Interval	20.4-171.2	14.1-193.4	22.3-133.4	8.65-71.9	13.8-68.1	10.8-56.0

Figure 1. Standard curves of *Streptococcus bovis* (a) and *Megasphaera elsdenii* (b) from pure cultures.

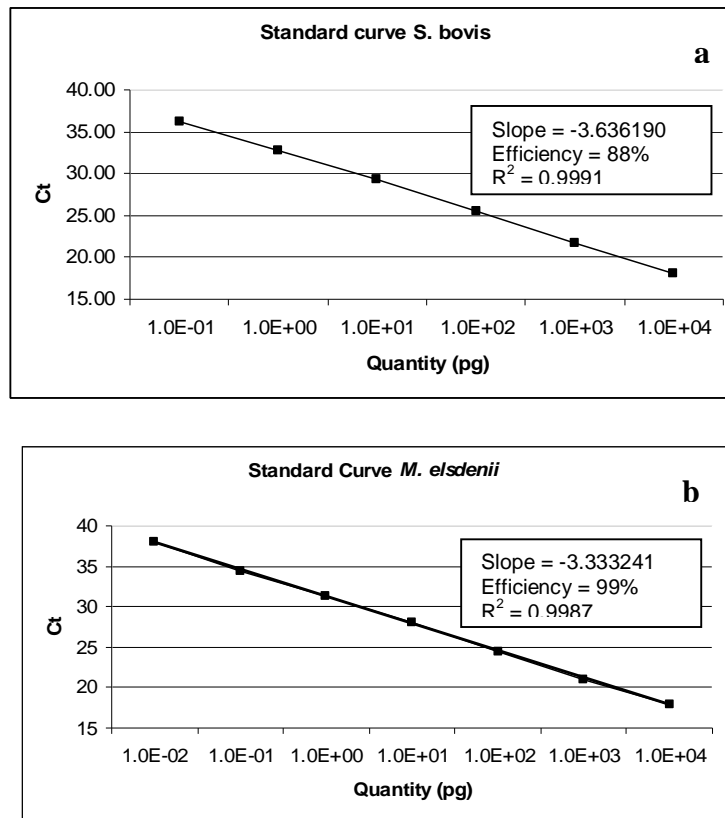
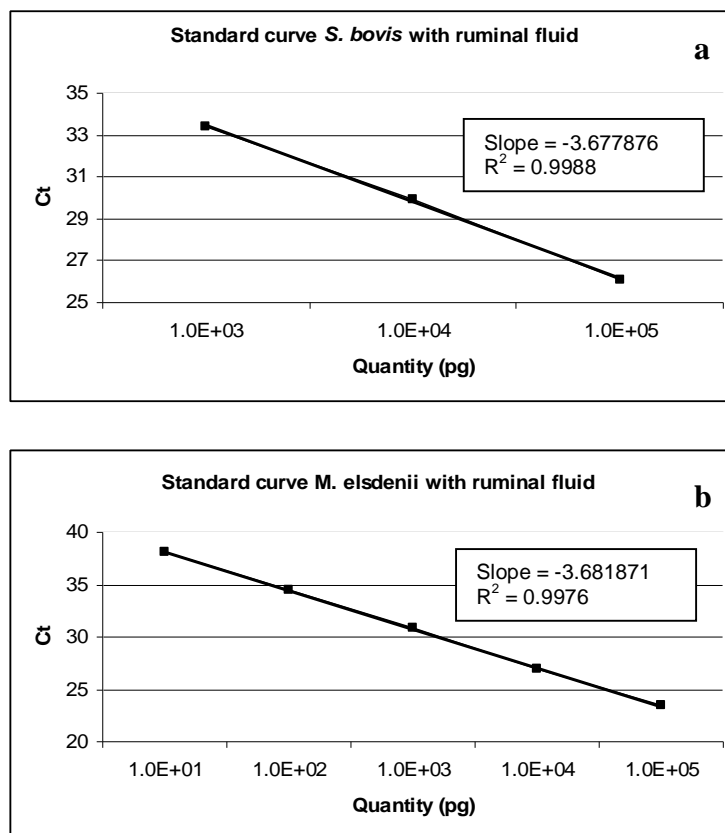


Figure 2. Serial dilutions (1/10) of ruminal fluid DNA with *Streptococcus bovis* (a) and *Megasphaera elsdenii* (b) primers.



CAPÍTULO 3

Experimento 2:

Effects of two dietary non-fiber carbohydrate levels on ruminal fermentation and animal metabolism of lactating cows.

Effects of two dietary non-fiber carbohydrate levels on ruminal fermentation and animal metabolism of lactating cows.

ABSTRACT: Sixty-two lactating Holstein cows (BW = 654 ± 14 kg, DIM = 186 ± 6.8, 40 multiparous and 22 primiparous), fitted with rumen cannulas (5 multiparous and 3 primiparous) were used to study the effects of two dietary non-fiber carbohydrates (NFC) levels on ruminal fermentation and animal metabolism following a cross-over design with 2 periods of 30 d each. Treatments were: a traditional ration (TR, 16.1% CP, 35.9% NDF, and 40.5% NFC, DM basis), and a high NFC ration (HC, 17.6% CP, 28.3% NDF, and 46.5% NFC, DM basis). Milk yield and feed intake were recorded daily and milk composition biweekly. The incidence of lameness and diarrhea were scored once a week. Animals were blood sampled to determine blood glucose, insulin, and urea concentrations within the first hour after the morning feeding in 2 separate days in each treatment. Faecal samples were taken 1 d in each treatment within the first hour after the morning feeding to determine total tract starch digestibility using lignin as an internal marker. Samples of ruminal contents were collected during 3 d in each treatment at 0, 4 and 8 h post-feeding to determine volatile fatty acids and ammonia N concentrations, and quantification of protozoa, *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii*. Rumen pH was recorded electronically at 22-min intervals during 6 d in each treatment. Milk yield was greater (33.7 and 31.5 kg/d), milk protein content was greater (3.33 and 3.21%), milk fat content was lesser (3.07 and 3.66%), and concentrate intake at the milking unit was lesser (2.62 and 3.73 kg/d) in HC compared with TR. Blood glucose and insulin concentrations were lesser in TR compared with HC (3.42 and 3.67 mmol glucose/L, and 0.582 and 0.849 µg of insulin/L, respectively), and HC resulted in a lesser total tract starch digestibility (94.6 and 96.0% for HC and TR, respectively). Rumen pH of HC cows fell below 5.6 for longer periods of time than that of TR cows (7.34 and 1.32 h/d, respectively), and mean pH of HC was lower compared with TR (5.85 and 6.28, respectively). Animals that received HC diet had four times more risk of lameness than TR group; however, no effects of treatment were observed in incidence of diarrhea. These results indicate that feeding high NFC diets to dairy cows for short periods of time may increase milk yield but may have negative effects on animal health and well-being.

Key words: dairy cows, non-fiber carbohydrates.

1. Introduction

High producing dairy cows require large amounts of high energy feeds to meet nutritional requirements for maintenance, milk synthesis, and reproduction. These energy requirements are often met by increasing non-fiber carbohydrates (NFC) in the diet. Non-fiber carbohydrates include starch, sugars, pectins, and β -glucans (Van Soest et al., 1991). However, changes in NFC are usually associated with an opposite change in NDF concentration. It is not really clear if the effects observed in rumen fermentation are due to the increase in NFC or the decrease in NDF content. Therefore, there are different acceptable alternatives to express the balance of carbohydrates in the diet: NFC content, NDF content, and NFC to NDF ratio.

Most studies have been conducted with levels of NFC between 20 and 40%. Dry matter intake (MacGregor et al., 1983; Batajoo and Shaver, 1994), milk yield (Minor et al., 1998; Schwab et al., 2006) and milk protein content (Sarwar et al., 1992; Batajoo and Shaver, 1994) increased when NFC levels increased. The NFC is a highly digestible energy source and its fermentation could accumulate acid in the rumen leading to a reduction of ruminal fluid pH (Sievert and Shaver, 1993a; Batajoo and Shaver, 1994) and milk fat content (Sievert and Shaver, 1993a; Schwab et al., 2006). However, other studies reported no differences (Sarwar et al., 1992; Sievert and Shaver, 1993b). Milk production has been reported to be optimal when cows fed diets containing about 40% NFC (Nocek and Russell, 1988), but the optimal concentration of NFC is not well defined (NRC, 2001). Few studies with NFC levels greater than 40% have been conducted and the results have been inconsistent. Minor et al. (1998) observed an increase in milk yield and milk protein content when NFC increased from 41.7 to 46.5% with no changes in DMI, but with a reduction on milk fat content. Other authors did not find changes in milk yield or composition (Harmison et al., 1997; Rabelo et al., 2003). Only two studies evaluated the response to different NFC levels above 40% in rumen fermentation: Rabelo et al. (2003) reported a decrease in ruminal pH and acetate:propionate ratio with an increase in NFC from 41.1 to 47.2%; in contrast, Beckman and Weiss (2005) compared three NFC concentrations (40.4, 43.7, and 48.3 %) and reported a quadratic increase in total volatile fatty acids (VFA) concentration.

Consequently, more studies are necessary to clarify the effects of feeding high levels of NFC to lactating dairy cattle. The objective of the present study was to evaluate the effects of two levels of NFC above 40% during a short period of time in lactating dairy cows on production, ruminal fermentation, and animal metabolism.

2. Materials and methods

Animals and treatments

A total of 62 lactating Holstein dairy cows (BW = 654 ± 14 kg; DIM 186 ± 6.8; 40 multiparous, 22 primiparous), 8 of them fitted with a rumen cannula (5 multiparous and 3 primiparous), were used over a period of 2 months. All cows were kept at the experimental research farm of the Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries in Monells (Girona, Spain) in loose housing conditions evenly distributed in 2 symmetrical pens, each containing 28 feeding places, 2 waterers (200 x 60 cm and 140 x 45 cm), and a robotic milking unit. Cows were on straw bedding (replaced every 2 d) and milked with an automatic milking system (AMS: VMS, DeLaval, Tumba, Sweden). Animals were maintained and handled under the supervision of the Animal Care Committee of the Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries. All cows had free access to the AMS 22.5 h/d (a total of 1.5 h was dedicated to the cleaning of the system). Cows were granted milking permission after 6 h from previous milking, unless a milking failure occurred, in which case cows would be granted permission to be milked again immediately. The milking status of each cow was checked at 0700, 0900, 1230, and 2030 h daily. Cows with more than 12 h since last milking were fetched and forced to visit the AMS at these times only.

Treatments were applied following a cross-over design with 2 periods and 2 treatments. Each period lasted 30 d. Treatments consisted of two partial mixed rations (PMR) with different levels of NFC: a traditional ration (TR) and a high NFC ration (HC) (Table 1). All cows received the same concentrate at the AMS (50% corn and 50% corn gluten feed, 54.9% NFC, 22.6% NDF, 16.7% CP, 7.78% ADF, 3.85% EE, and 1.77 Mcal of NE_L/kg, DM basis). Cows were fed the PMR twice daily.

Measurements and sample collection

Individual milk production was recorded at each milking by the AMS, and milk composition (fat and protein) was determined biweekly at an official laboratory

(ALLIC, Cabrils, Spain). Individual eating behaviour (time spent feeding and eating) and feed consumption were continuously monitored throughout the study using a computerized system (Bach et al., 2004). Feed and refusal samples were collected daily and analyzed for DM to determine DMI. The incidence of lameness and diarrhea was scored once a week by the same observer. Lameness was assessed through locomotion score (Sprecher et al., 1997). Cows with locomotion scores ≥ 4 were considered lame. Diarrhea was assessed through fecal consistency, with a tail scoring system (scale 1-3), score 1 when firm, 2 when soft, and moderate consistency, and 3 when diarrhea; cows with wet and dirty tails (fecal score > 2) were considered to have diarrhea.

Animals were blood sampled to determine blood glucose, insulin, and urea concentrations within the first hour after the morning feeding in 2 separate days in each period. Fecal samples were taken 1 d in each period within the first hour after the morning feeding to determine apparent total tract starch digestibility using lignin as an internal marker. Samples of ruminal contents were collected from the 8 rumen-cannulated cows during 3 d in each treatment at 0, 4 and 8 h post-feeding. Ruminal fluid was strained through 2 layer of cheesecloth, and 4 sub-samples of filtrate taken for the determination of VFA, ammonia N, enumeration of protozoa, and DNA extraction for quantitative real time PCR (**qPCR**) of *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii*. Rumen pH was recorded electronically at 22-min intervals during 6 d in each treatment.

Chemical analyses

Feed DM was determined by oven drying at 105 °C for 24 h (AOAC, 1990; ID 950.01) and ashes by heating the feed at 550 °C for 4h (AOAC, 1990; ID 942.05). The NDF and ADF contents of the diet were analyzed by the detergent system, using the sequential procedure of Van Soest et al. (1991), with sodium sulfite, a thermostable amylase, and correcting for ashes.

Enzymatic determination of serum glucose was conducted following the HK/G-6-PDH method (Burrin and Price, 1985). Serum insulin was determined using ELISA (Mercodia, Uppsala, Sweden).

Total starch of faecal samples was measured by the method of Theander (1991). The lignin content of the faecal samples was determined by the detergent system, using the

sequential procedure of Van Soest et al. (1991), with sodium sulfite, a thermostable amylase, and correcting for ashes.

Total and individual VFA were prepared as described by Jouany (1982) and analyzed by gas chromatography: 1 mL of a solution made up of 0.2% solution of mercuric chloride, 0.2% of 4-methylvaleric acid as an internal standard, and 2% orthophosphoric acid, was added to 4 mL of filtered rumen fluid and frozen at -20 °C. Samples were centrifuged at 15,000 x *g* for 15 min at 7 °C, and the supernatant was analyzed by gas chromatography (model 6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using polyethylene glycol nitroterephthalic acid-treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., Buckinghamshire, UK) at 275 °C in the injector and 29.9 mL/min gas flow rate.

Ammonia N concentration was analyzed as described by Chaney and Marbach (1962): 4 mL sample of filtered rumen fluid was acidified with 4 mL of 0.2 N HCl and frozen at -20 °C. Samples were centrifuged at 15,000 x *g* for 15 min, and the supernatant analyzed by spectrophotometry (Libra S21, Biochrom Analytical Instruments, Cambridge, UK).

For enumeration of protozoa, 1 mL of filtered rumen fluid was mixed with 9 mL of methyl green:formaldehyde (38% wt/wt) solution. Entodiniomorphs and holotrichs were identified (Dehority, 1993) and counted as described by Veira et al. (1983) using a Neubauer Improved Bright-Line counting chamber (Hauser Scientific Partnership, Horsham, PA). Protozoal counts were transformed to a base 10 logarithm before statistical analysis.

For DNA extraction, rumen fluid samples were aliquoted in sterile eppendorfs of 1.5 mL and frozen at -20 °C. Deoxyribonucleic acid from rumen fluid samples was extracted by physical disruption using a bead-beating method (Mini-Beater; Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) following the protocol described by Whitford et al. (1998) with some modifications (Blanch et al., 2007). For qPCR, primers and probes used in this trial are listed in Table 2. All samples were run in triplicate for standard curve points or in duplicate for ruminal samples in a 20 µL reaction volume containing 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), primers at a final concentration of 900 nM each, 250 nM probe, and 100 ng of genomic DNA (5 µL of

ruminal fluid samples at 20 ng/ μ L). The PCR was run in the ABI PRISM[®] 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) using optical grade 96 well-plates using the following amplification parameters: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, and 40 cycles of 15s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Reactions without DNA were always used as negative controls in each run.

Statistical Analyses

Intake and milk yield data were summarized by week. For milk composition and blood metabolites (insulin, glucose and urea), the average within period was used for the analysis. For rumen data (VFA, ammonia N, qPCR and protozoa counts), the average among days at each sampling time was used for the analyses. For rumen pH, the average of each day was used for the analyses. For apparent total tract starch digestibility, only one measurement within period was used. All statistical analyses were conducted using PROC MIXED of SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA, version 8.2). Period was considered a random effect in all analyses. The degrees of freedom were corrected by Satterth's optimization. The statistical model included treatment, sequence in the cross-over, stage of lactation, parity, and the interactions of treatment with parity and treatment with stage of lactation (the last one only if it was significant). The stage of lactation of each cow was classified as a 4-class ordinal variable using the quartiles of the DIM distribution as cutoffs when the interaction treatment by stage of lactation was significant. Intake, milk yield, and all rumen data were analyzed using PROC MIXED for repeated measures (Littell et al., 1998) using the Compound Symmetry structure. A mixed-effects logistic regression model was used to determine the impact of treatment on lameness and diarrhea occurrence. The model accounted for the random effect of cow, and the fixed effects of the relationship between samplings across time within cow, sequence in the cross-over, period, and treatment (NFC level) using STATA program (Stata Corporation, College Station, Texas, USA).

3. Results and discussion

Most studies that compare different levels of NFC used concentrations below 40%, similar to NRC (2001) recommendations (Sarwar et al., 1992; Schwab et al., 2006). Because effects may be different in diets with NFC content below or above 40%, the discussion will be limited to studies that compared NFC levels above 40% (Batajoo and

Shaver, 1994; Harmison et al., 1997; Minor et al., 1998; Rabelo et al., 2003; Beckman and Weiss, 2005).

No differences in total and PMR intakes were observed, in agreement with some earlier studies (Minor et al., 1998; Beckman and Weiss, 2005), although a greater ($P < 0.05$) concentrate intake was observed in cows that received the TR diet (Table 3). The concentrate was offered at the AMS and a greater milking frequency in the TR group was observed compared with the HC group (2.32 and 2.01 ± 0.057 milks/d, respectively). Therefore, the final nutrient content of the consumed diet was affected by the proportions of concentrate and PMR intakes. Consequently final nutrient contents of the consumed diets were (DM basis) 42.9 and 47.4% NFC, 33.8 and 27.5% NDF, 19.6 and 14.8% ADF, 16.2 and 17.4% CP, 4.14 and 3.96% EE, 1.64 and 1.68 Mcal of NE_L /kg net energy for TR and HC diet, respectively.

Milk yield and composition are shown in Table 3. An increase in dietary NFC increased milk yield by 2.2 kg/d, and this agrees with Minor et al. (1998), but other studies did not observe any response (Harmison et al., 1997; Rabelo et al., 2003; Beckman and Weiss, 2005). The HC diet resulted in an increase in plasma glucose (3.67 and 3.42 ± 0.04 mmol/L, HC and TR, respectively, $P < 0.001$). A greater availability of glucose to the mammary gland has an important impact on milk yield because lactose is the major osmoregulator in mammary secretion of water (Lemosquet et al., 2004). Milk protein content was 0.12 percentage units greater for cows fed HC compared with those fed TR, as other authors have previously reported (Batajoo and Shaver, 1994; Minor et al., 1998), and could be explained by an increase in aminoacid (AA) supply to the mammary gland in animals receiving greater levels of NFC. One explanation for the increase in AA supply with HC diet could be an increase in microbial growth and protein synthesis in response to an increase in ruminally available carbohydrates (Stern et al., 1978; Russell et al., 1992); another possible justification could be a decrease in the utilization of AA for gluconeogenesis, because we observed a numerical decrease in ammonia N and branched chain VFA in the diet with the high level of NFC. However, some studies have not found changes in milk protein content (Harmison et al., 1997; Beckman and Weiss, 2005). Milk fat content was about 0.59 percentage units lower with the HC compared with the TR diet. This classic pattern of depressed milk fat content with elevated NFC in the diet has been extensively reported (Minor et al., 1998;

Beckman and Weiss, 2005), although other studies have not observed changes (Harmison et al., 1997; Rabelo et al., 2003). In the present study, milk fat depression could be explained by different theories: gluconeogenic-insulin theory, due to the greater glucose and insulin plasma contents in HC compared with TR (0.849 and 0.582 \pm 0.047 μ g insulin/L, HC and TR, respectively, $P < 0.001$); and by the acetate to propionate ratio theory, supported by the lower acetate to propionate ratio and acetate proportion in diets with a greater level of NFC (Table 4). A third theory could be the *trans* fatty acids one (Bauman and Griinari, 2003), but could not be supported because the fatty acids profile was not determined in the present trial.

Apparent total tract starch digestibility decreased as the NFC content of the diet increased (96.0 and 94.6%, TR and HC, respectively, $P < 0.001$), because starch intake increased as NFC content increased. However, total starch intake and digested was greater ($P < 0.001$) in HC compared with TR (9.81 and 7.61 kg/d, and 9.28 and 7.31 kg/d, respectively). This result agrees with other studies (Batajoo and Shaver, 1994; Beckman and Weiss, 2005). Nocek and Tamminga (1991) reported that as starch delivery increased, starch digestion, as a percentage of that entering the small intestine, decreased. Nevertheless, other studies did not observe differences (Harmison et al., 1997; Schwab et al., 2006). Animals who received HC diet had four times more risk of lameness than the TR group (odds ratio = 4.03, 95% confidence interval = 1.84 - 8.85, $P < 0.001$); however no effects of treatment were observed in diarrhea (odds ratio = 0.753, 95% confidence interval = 0.200-2.84, $P > 0.05$). Laminitis and diarrhea are often associated with ruminal acidosis (Owens et al., 1998).

Ruminal fermentation data are shown in Table 4. No significant treatment per hour interaction was detected. Acetate proportion was lesser in HC compared with TR diet. TR diet had more fiber content that stimulate fibrolytic bacteria which most of them are acetate producers; conversely, HC cows consumed a greater content of starch in the diet that stimulate amilolytic bacteria that are propionate producers. Moreover, ruminal pH affects ruminal fermentation, and acetate concentration decreased with decreasing pH. Calsamiglia et al. (2008) reported that ruminal pH was the major determinant of the concentration of acetate. The acetate to propionate ratio tended ($P < 0.10$) to be lower in HC compared with TR. The decrease in acetate to propionate ratio in HC diet was a consequence of the decrease in acetate and the numerically increase in propionate.

Calsamiglia et al. (2008) reported that propionate concentration resulted from the combined effects of pH and diet, which contributed 55 and 45% of the variation, respectively. Total VFA, propionate and butyrate proportion, branched-chain VFA and ammonia N concentrations in the rumen were not affected by treatment.

The HC diet decreased the average ruminal pH and increased the number of hours with a pH below 5.6. There was a significant interaction between treatment and number of hours at pH below 5.6, and primiparous cows were more hours with suboptimal pH than multiparous cows in the HC diet. The increased accumulation in total VFA and the reduction in ruminal pH were expected because of the increase in rapidly fermented carbohydrates (Owens et al., 1998; Coe et al., 1999). Although the increase in total VFA concentration was not significant, it could explain the decrease in pH in HC diet because pH and total VFA concentration were highly correlated ($R^2 = 0.65$). Moreover, eating rate was greater ($P < 0.05$) and the time spent eating was lesser ($P < 0.001$) in HC compared with TR (294.3 and 229.9 ± 17.6 g PMR/min, 156.2 and 200.0 ± 5.92 min/d, respectively), which may be also related to a reduction in pH.

The quantification of *S. bovis* and *M. elsdenii*, main lactic acid producer and user, respectively, suggested that lactic acid accumulation was not responsible of the decrease in pH, because *S. bovis* quantification was lower ($P < 0.01$) in HC than in TR (31.6 and 86.1 ± 8.50 ng DNA/mL ruminal fluid, respectively). Moreover, *S. bovis* to *M. elsdenii* ratio was not different between treatments (41.2 and 38.6 ± 22.0 , TR and HC, respectively).

In our experiment, protozoal counts were in the same range as other in vivo experiments (Nagaraja et al., 1992; Cardozo et al., 2006), and no differences were observed between treatments (averaged $5.46 \log_{10}$ and $3.65 \log_{10}$ counts/mL, entodiniomorphs and holotrichs, respectively). Previous works using high-grain diets observed decreases in protozoa counts when pH decreased (Slyter et al., 1970; Hristov et al., 2001), while others reported increases of entodiniomorphs, because these protozoa phagocyte starch very rapidly (Williams and Coleman, 1988) and compete with amylolytic bacteria for their substrate (Newbold, 1987; Owens et al., 1998) avoiding declines in pH.

Nevertheless, in this study we observed a decrease in pH without changes in protozoa counts.

4. Conclusions

The present study compared two levels of NFC in the diet of dairy cows, one in the high limit (42.9%) of the NRC (2001) recommendations, and the other one, well above this limit (47.4%). Results indicate that it was possible to exceed NRC recommendations for a short period of time, increasing milk yield, but this would incur in negative effects on animal health.

Table 1. Ingredient and nutrient composition of the experimental diets (TR = traditional ration, HC = high NFC ration).

	TR	HC
Ingredient composition, % DM		
Alfalfa hay	13.0	-
Corn silage	51.5	50.3
Barley	6.61	-
Corn	6.61	23.7
Wheat	1.43	-
Whole cotton seed	5.72	3.08
Soybean meal	5.09	11.7
Corn gluten feed	2.29	2.46
Soybean hulls	2.86	4.62
Wheat midds	4.29	3.29
Calcium carbonate	0.14	0.34
Magnesium oxide	0.11	0.12
Salt	0.17	0.18
Vitamin-mineral premix ¹	0.14	0.15
Nutrient composition		
CP, %	16.1	17.6
NDF, %	35.9	28.3
ADF, %	21.8	15.8
NFC, %	40.5	46.5
EE, %	4.19	3.99
Net energy, Mcal of NE _L /kg	1.61	1.68

¹Composition: 3.750 kIU/kg of vitamin A, 750 kIU/kg of vitamin D, 2.5 mg/kg of vitamin E, 2.5 g/kg of Fe, 12.5 g/kg of Zn, 1.25 g/kg of Cu, 10 g/kg of Mn, 0.1 g/kg of Co, and 0.4 g/kg of I.

Table 2. Primers, Taqman probes-MGB, and PCR conditions used in this study.

Target	Sequence (5'3')	Ann. T ^{a1}	Fw ² μM	Rv ³ μM	Probe μM	Reference
<i>Streptococcus bovis</i>	Fw. GATAGCTAATACCGCATAACAGCATT	60	0.9	0.9	0.25	Blanch et al., 2007
	Rv. AACGCAGGTCCATCTACTAGTGAA					Blanch et al., 2007
	P ⁴ . TGCTCCTTTCAAGCAT					Blanch et al., 2007
<i>Megasphaera elsdenii</i>	Fw. GACCGAAACTGCGATGCTAGA	60	0.9	0.9	0.25	Ouwerkerk et al., 2002
	Rv. CGCCTCAGCGTCAGTTGTC					Ouwerkerk et al., 2002
	P. ACTGGTGTTTCCTCCTAATA					Blanch et al., 2007

¹Ann. T^a = annealing temperature.

²Fw = forward primer.

³Rv = reverse primer.

⁴P = probe.

Table 3. Effect of non-fiber carbohydrate level of the ration on feed intake, and on milk yield and composition.

	TR ¹	HC ²	SEM ³	P-value ⁴
Concentrate, kg/d	3.73	2.62	0.150	***
PMR, kg/d	19.3	19.0	0.891	NS
Total, kg/d	23.0	21.7	0.925	NS
Milk yield, kg/d	31.5	33.7	1.30	*
Protein, %	3.21	3.33	0.029	*
Fat, %	3.66	3.07	0.087	**

¹TR = traditional ration.

²HC = high NFC ration.

³SEM = standard error of the means.

⁴NS = $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Table 4. Effect of non-fiber carbohydrate level of the ration on ruminal parameters.

	TR ¹	HC ²	SEM ³	P-value ⁴
Total VFA, mM	132.6	141.6	9.05	NS
Acetate, %	64.1	58.6	1.53	*
Propionate, %	20.3	24.8	2.01	NS
Butyrate, %	11.8	12.9	0.702	NS
Acetate:Propionate	3.26	2.52	0.270	†
Branched-chain VFA,%	2.38	2.15	0.190	NS
Ammonia N,	12.8	11.4	1.20	NS
pH<5.6, h/d				
Primiparous	1.66	9.72	0.891	***
Multiparous	0.972	4.95	0.680	**
Average pH	6.28	5.85	0.035	***

¹TR = traditional ration.

²HC = high NFC ration.

³SEM = standard error of the means.

⁴NS = $P > 0.05$, † $P < 0.10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

CAPÍTULO 4

Experimento 3:

Physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation in heifers

Physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation in heifers

ABSTRACT: Physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation (**PAP**) in heifers were studied in a completely randomized experiment using 12 crossbred heifers (452 ± 20 kg BW). Treatments were control (**CTR**) or PAP. The acidosis induction protocol composed 3 periods: 3 mo of 100% fescue hay feeding ad libitum, 10 d (from d 1 to 10 of the experiment) of adaptation to the treatment (100% forage feeding + 10 mL/d of PAP top-dressed to the treatment group) and 5 d (from d 11 to 15 of the experiment) of transition that consisted of increasing 2.5 kg/d of concentrate (16.5% CP) up to 12.5 kg, fescue ad libitum and 10 mL of PAP in the treatment group. Concentrate feeding level at 12.5 kg/d was maintained until heifers developed acidosis (from d 16 to 22 of the experiment). When an animal was considered acidotic it was changed to a 50:50 forage:concentrate diet, monitored for 4 d and taken out of the experiment. Samples of ruminal fluid were collected at 0 and 6 h post feeding to determine pH, volatile fatty acids (**VFA**), lactate, protozoa counts, and DNA extraction for quantitative real time PCR (**qPCR**) and denaturing gradient gel electrophoresis analyses (**DGGE**). Only samples collected during adaptation to the treatment, 3 and 1 d before acidosis, acidosis day, and 1 and 4 d after acidosis day, were analyzed. Data were analyzed using PROC MIXED of SAS. Differences were declared at $P < 0.05$. Animals (83.3% in CTR and 50.0% in PAP) entered into acidosis 5.25 ± 0.17 d after the start of transition. However, the fermentation profile of animals with acidosis was similar between treatments. From 3 d before acidosis to acidosis day, a decrease of pH and acetate to propionate ratio, and an increase in total VFA, butyrate and entodiniomorph counts was observed. However, the greatest levels of *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii* (78.5 ± 53.9 and 104.1 ± 72.6 ng DNA/mL ruminal fluid, respectively) and a decrease in DMI (10.6 and 6.46 kg, respectively) were recorded 1 d after acidosis. Heifers fed PAP had greater pH at 0 h post-feeding on d 6 (6.70 vs 6.11), 8 (6.54 vs 5.95) and 9 (7.26 vs 6.59) after the start of the feeding challenge compared with CTR. Heifers fed PAP tended to have greater total VFA concentration than CTR (124.4 and 114.3 ± 3.96 mM, respectively). These results indicate that PAP may be effective in controlling acidosis of heifers during a rapid transition to a high-concentrate diet.

Key words: acidosis, antibody, microbial profile, rumen fermentation.

1. Introduction

Ruminal acidosis is one of the most common nutritional disorders in feedlot and dairy cattle, and it is the result of the intensification of animal production systems. The increase in the proportion of rapidly fermentable carbohydrates results in the accumulation of volatile fatty acids (VFA) and lactate, thereby increasing the risk of acidosis. The economic impact of ruminal acidosis in the US was estimated to be 500 to 1,000 million US\$ each year (Stone, 1999). However, there is limited research describing the physiological changes occurring in the rumen during the development of acidosis in beef cattle (Goad et al., 1998; Coe et al., 1999; Bevans et al., 2005).

Ionophores have been used in animal feeds because of their ability to reduce the risk of acidosis and bloat (Chalupa et al., 1980; Bergen and Bates, 1984). However, EU legislation banned the use of antibiotics in animal feeds in January 2006 (OJEU, 2003). For this reason, the dairy and beef industries in the EU are actively searching for alternative acidosis-reduction strategies. Novel strategies against acidosis are focussing on the control of bacteria involved in the production (*Streptococcus bovis*) and utilization (*Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium*) of lactate. The addition of *M. elsdenii* as a probiotic to rumen fluid in vitro and in vivo resulted in a decrease in lactic acid concentration and an increase in pH (Klieve et al., 2003; Kung and Hession, 1995). Vaccination against *S. bovis* was successful in maintaining greater rumen pH and decreasing L-lactate concentration (Gill et al., 2000; Shu et al., 2000). Similarly, preparations of polyclonal antibodies against *S. bovis* (**PAP-Sb**) or *Fusobacterium necrophorum* (**PAP-Fn**) were successful in reducing rumen concentrations of target bacteria and increasing pH in steers fed high-grain diets (DiLorenzo et al., 2006, 2008).

The objectives of the present study were to describe physiological changes during an acidosis induction and to study the effects of feeding a multivalent polyclonal antibody preparation against several ruminal microorganisms and immunogens (**PAP**) on fermentation and microbial patterns during this induction in heifers.

2. Materials and methods

Animals, Housing and Treatments

Twelve crossbred heifers (average initial BW 452 ± 20 kg) were fitted with 1 cm i.d. plastic ruminal trocars (Divasa Farmavic SA, Vic, Spain). Animals were individually housed in tie-stalls at the Unitat de Granges i Camps Experimentals of the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain) and were randomly assigned to 1 of the 2 experimental treatments. All animal housing and handling procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain). Treatments consisted of top-dressing: no additive (**CTR**) or 10 mL (5 mL twice a day) of PAP (RMT OptimizeTM, CAMAS Inc., Le Center, MN). The commercial product contains immunoglobulins mainly against *S. bovis* (ATCC 9809) and less quantities against *F. necrophorum* (ATCC 27852), *Clostridium sticklandii* (ATCC 12662), *Clostridium aminophilum* (ATCC 49906), *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 49031), and *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895). *Streptococcus bovis* is a main lactic acid producing bacteria, *F. necrophorum* is involved in the development of liver abscesses in acidotic animals, *C. sticklandii*, *C. aminophilum* and *P. anaerobius* are hyper-ammonia producing bacteria, and *E. coli* O157:H7 is a human pathogen that develops in ruminants under acidosis.

Acidosis Induction Protocol

The acidosis induction protocol included 3 periods: 100% fescue hay feeding ad libitum for 3 mo; 10 d (d 1 to 10 of the experiment) of adaptation to treatment (100% fescue hay feeding and 10 mL/d of PAP top-dressed to the treatment group only); and the high concentrate feeding challenge, when concentrate feed was increased 2.5 kg/d to reach 12.5 kg/d (d 11 to 15 of the experiment) with fescue hay offered ad libitum, and heifers in the treatment group receiving 10 mL/d of PAP. Concentrate feeding level was maintained at 12.5 kg/d until heifers developed acidosis (d 16 up to 22). Acidosis was declared when rumen pH reached 5.5 and(or) when concentrate intake was decreased more than 50% compared with the previous day. When an animal was considered acidotic, diet was changed to 50:50 forage:concentrate, and after 4 d on this diet, the animal was taken out of the experiment. Animals not declared in acidosis 12 d after the start of the transition (d 22 of the experiment) were considered acidosis-resistant.

Feeds

Fescue hay (10.6% CP, 59.7% NDF, and 31.6% ADF, DM basis) was the forage source, and the concentrate (16.5% CP, 17.4% NDF, and 8.32% ADF, DM basis) consisted

(DM basis) of ground barley grain (38.5%), ground corn grain (29%), soybean meal (12.3%), soybean hulls (7.5%), corn gluten feed (6.5%), sunflower (4.0%), calcium carbonate (0.7%), sodium bicarbonate (0.5%), dicalcium phosphate (0.5%), sodium chloride (0.5%) and a vitamin and mineral mixture (0.5%; 1 kg DM of the vitamin and mineral mixture contained 1,5612 K IU vitamin A, 150 K IU vitamin D, 2,500 mg vitamin E, 3,500 mg zinc, 2,000 mg iron, 400 mg manganese, 250 mg cooper, 50 mg cobalt, 38 mg iodine and 25 mg selenium).

Sample Collection and Analyses

Daily DMI was measured individually. Feed refusals were recorded before the morning feeding. Refused concentrate and fescue hay were manually separated using a 0.5-cm screen sieve, and weighed separately. Feed and refusal samples were collected daily and analyzed for DM to determine DMI. Dry matter was determined by oven drying at 105 °C for 24 h (AOAC, 1990; ID 950.01) and ash by heating at 550 °C for 4 h (AOAC, 1990; ID 942.05). The NDF and ADF content of the diet were analyzed by the detergent system, using the sequential procedure of Van Soest et al. (1991), with sodium sulfite, a thermostable amylase, and corrected for ash.

Samples of ruminal fluid were collected at 0 and 6 h after feeding at the end of the adaptation period (d 10), and daily during the challenge period. However, only samples taken during adaptation to the treatment, d 3 and 1 before acidosis, the day of acidosis, and d 1 and 4 after acidosis were analyzed. Ruminal fluid was strained through 2 layers of cheesecloth, and pH measured immediately with a portable pH-meter (model 507, Crison Instruments SA, Alella, Spain). Three sub-samples of filtrate were taken for the determination of VFA and lactate, enumeration of protozoa and DNA extraction for quantitative real time PCRs (**qPCR**) and denaturing gradient gel electrophoresis analyses (**DGGE**).

Volatile fatty acids and lactate concentrations in ruminal fluid were analyzed by a modification of the capillary gas chromatography method described by Richardson et al. (1989). Modifications were applied to the sample preparation and conservation. To conserve samples, 4 mL of ruminal fluid were added to 1 mL of a solution made up of 1% (wt/wt) mercuric chloride, 2% (vol/vol) orthophosphoric acid, and 0.2% (wt/wt) 4-methylvaleric acid as an internal standard in distilled water and stored at -20 °C

(Jouany, 1982). As a pre-analysis treatment, samples were thawed and centrifuged at $15,000 \times g$ for 15 min and diluted 1:1 in distilled water. The supernatant was analyzed by gas chromatography (model 6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using an Agilent DB-5 column ($10\text{m} \times 100 \mu\text{m} \times 0.10 \mu\text{m}$) fitted to a flame ionization detector ($275 \text{ }^\circ\text{C}$ injector temperature and 29.9 mL/min gas flow rate).

For enumeration of protozoa, 1 mL of filtered rumen fluid was mixed with 9 mL of methyl green:formaldehyde (38% wt/wt) solution. Entodiniomorphs and holotrichs were identified (Dehority, 1993) and counted as described by Veira et al. (1983) using a Neubauer Improved Bright-Line counting chamber (Hauser Scientific Partnership, Horsham, PA). Protozoal counts were transformed to base-10 logarithms before statistical analysis.

For DNA extraction, rumen fluid samples were aliquoted in sterile eppendorfs of 1.5 mL (Deltalab SL, Rubí, Spain) and stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Deoxyribonucleic acid from rumen fluid samples was extracted by physical disruption using a bead-beating method (Mini-Beater; Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) following the protocol described by Whitford et al. (1998) with some modifications (Blanch et al., 2007).

For qPCR, primers, probes, and the PCR conditions used in this trial are listed in Table 1. All samples were run in triplicate in 2 independent experiments. The qPCR was run in the iCycler iQ thermal cycler (Bio-Rad[®], Hercules, CA, USA). Results were analyzed using the iCycler iQ detection system software (Bio-Rad[®], Hercules, CA, USA).

For DGGE analyses, PCR amplification across the 16S rRNA V6 V8 region was carried out by using the primers F968gc and R1401 for eubacteria (Huws et al., 2007). Sample DNA (1 ng) was added to a 25 μL reaction mix containing 0.50 μM each primer, 0.20 mM dNTPs, 3.00 mM MgCl_2 and 0.05 U Taq DNA polymerase in 10 mM Tris/HCl (pH 9.0). Amplification conditions were 40 cycles with 15 s at $94 \text{ }^\circ\text{C}$ for denaturation, 15 s at $56 \text{ }^\circ\text{C}$ for annealing, and 1 min at $72 \text{ }^\circ\text{C}$ for extension, except for 3 min denaturation in the first cycle and 5 min extension in the last cycle. The PCR amplification products were visualized on 2% (wt/vol) agarose gels before DGGE analysis.

The DGGE was performed by using the Bio-Rad DCode universal mutation-detection system (Bio-Rad[®], Hercules, CA, USA), following the manufacturer's guidelines. The PCR products (5 µL) were loaded onto 6% (wt/vol) polyacrylamide gels in 1 x TAE [40 mM Tris base, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA (pH 8.3)] that contained a 40–60% denaturant gradient [100% denaturant, 0.70 M urea, 40% (vol/vol) deionized formamide]. Electrophoresis was performed at a constant voltage (85 V) and temperature (60 °C) for 16 h. Gels were then stained for 15 to 30 min with a silver nitrate solution (0.2%) and the gel image was saved with a Bio-Rad GelDoc 2000 gel-documentation system (Bio-Rad[®], Hercules, CA, USA). The DGGE profiles within the same gels were compared using similarity trees (Dice).

Statistical Analyses

All statistical analyses were conducted using SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA, version 8.2). Results were analyzed using PROC MIXED for repeated measures (Littell et al., 1998) with animal treated as a random effect and using the Compound Symmetry structure, according to the following models: $y_{ik} = \mu + H_i + T_k + (H*T)_{ik} + \varepsilon_{ik}$, $y_{jk} = \mu + D_j + T_k + (D*T)_{jk} + \varepsilon_{jk}$, and $y_{ij} = \mu + H_i + D_j + (H*D)_{ij} + \varepsilon_{ij}$, where y was the dependent variable, μ was the mean value, H_i was the hour post-feeding effect (fixed factor), T_k was the treatment effect (fixed factor), D_j was the day effect (fixed factor), and ε was the error. Differences were declared at $P < 0.05$ and tendencies at $P < 0.10$.

3. Results and discussion

There were no interactions between main factors and, therefore, only main effects are discussed. The results and discussion will be divided in 2 sections: changes occurring during the induction of acidosis, and the effects of PAP.

Acidosis induction

There is limited research describing the changes in ruminal fermentation during a rapid change from a high-forage to a high-concentrate diet in beef cattle (Goad et al., 1998; Coe et al., 1999; Bevans et al., 2005). For this reason, this type of study is important to understand the development of ruminal acidosis during this transition period.

At the end of the adaptation period and just before the start of the feeding challenge, DMI (9.78 ± 0.420 kg), total VFA (109.1 ± 5.69 mM), acetate (71.6 ± 0.32 mol/100 mol), propionate (16.9 ± 0.36 mol/100 mol), butyrate (9.32 ± 0.198 mol/100 mol), acetate to propionate ratio (4.24 ± 0.103) and pH (6.90 ± 0.142) were within normal ranges for a high forage diet (France and Siddons, 1993).

At the end of the acidosis induction protocol in this experiment, 66.7% of animals developed acidosis, after an average of 5.25 ± 0.17 d. The remaining heifers (33.3%) did not develop acidosis after 14 d of the challenge with a high-concentrate diet. Acidosis was diagnosed by a decrease of ruminal pH (62.5%) or a decrease in concentrate DMI relative to the previous day (37.5%).

Total voluntary and concentrate intake increased over time until the acidosis day, decreased 1 d after acidosis and recovered to initial levels 4 d after acidosis (Table 2). The forage intake decreased over time until acidosis day, and then started to increase to the initial values 4 d after acidosis (Table 2). This response was a direct effect of the experimental design.

Ruminal pH and fermentation profile. The least square means of ruminal pH and lactate are shown in Table 3. During the acidosis challenge, ruminal pH declined over time until acidosis day, reaching a minimum at 6 h post-feeding (5.54). Ruminal pH started to recover immediately after the acidosis day, reaching values comparable to initial values by 4 d after acidosis. The ruminal pH at 6 h post-feeding was always lower than at 0 h post-feeding, except 1 d after acidosis during which there was no significant difference. Lactate tended to increase over time until 1 d after acidosis and then decreased. Moreover, there was a large variation in ruminal lactate concentrations (from 0 to 48.3 mM), which suggest that some of the heifers were in acute acidosis, whereas others were not (Dirksen, 1970; Harmon et al., 1985; Bauer et al., 1995). Volatile fatty acid profiles are shown in Table 4. Total VFA, propionate (only at 6 h post-feeding) and butyrate increased over time until acidosis day, and their concentrations started to decrease back to initial values 1 d after the acidosis day. The increased accumulation in total VFA and the reduction of ruminal pH was expected because of the increase in rapidly fermented carbohydrates (Coe et al., 1999; Owens et al., 1998). Acetate and

acetate to propionate ratio decreased over time until acidosis day, and then increased until d 4 after acidosis. In most cases, total VFA, propionate, and butyrate were greater at 6 h than 0 h post-feeding. However, acetate to propionate ratio and acetate concentration were lower at 6 h than 0 h post-feeding.

Microbial profile. Lactate-producing bacteria (*S. bovis*) increased over time, reaching the greatest level 1 d after acidosis at 6 h post-feeding (78.5 ± 53.9 ng/mL ruminal fluid; Table 5), which could be explained by the low pH recorded the day before (Table 3; Hungate, 1966; Marounek and Bartos, 1987). During the transition from a forage to concentrate diet, most authors report an initial increase in amylolytic bacteria, mainly as *S. bovis* (Goad et al., 1998; Owens et al., 1998; Tajima et al., 2001). *Streptococcus bovis* is considered the major lactate-producing bacteria, which is consistent with the maximum level of lactate 1 d after acidosis, although differences were not significant. Numerically, lactate-utilizing bacteria (*M. elsdenii*) increased 925-fold from d 1 of the experiment to d 1 after acidosis (0.123 vs 83.0 and 0.087 vs 104.1, at 0 and 6 h post-feeding, respectively), and then decreased 24-fold from d 1 to d 4 after acidosis (Table 5). It is likely that the large increase in *M. elsdenii* during the induction of acidosis explains the lack of significant differences in lactate concentration (Table 3). In the adaptation to the high-concentrate diet, a large but non-significant increase of *M. elsdenii* was also observed (Table 5) and agrees with other authors that reported an increase in lactate-utilizing bacteria (*M. elsdenii* and *S. ruminantium*) during this period in in vivo experiments (Dehority and Orpin, 1988; Goad et al., 1998; Tajima et al., 2000).

Protozoa counts are shown in Table 6. Entodiniomorph counts increased until acidosis day and then decreased 1 d after acidosis, although 4 d after acidosis had similar numbers to the acidosis day. However, on the acidosis day, entodiniomorph counts were greater at 0 h than 6 h post-feeding. The increase of entodiniomorphs could explain the limited increase in *S. bovis* during the induction of acidosis, because these protozoa phagocyte starch very rapidly (Williams and Coleman, 1988) and compete with amylolytic bacteria for their substrate (Newbold et al., 1987; Owens et al., 1998). Moreover, because protozoa are butyrate producers, their increase may also explain the increase in butyrate concentration (Brossard et al., 2004; Hungate, 1966; William and Coleman, 1988). Furthermore, *M. elsdenii*, the major producer of butyrate from lactate

(Counotte et al., 1981), increased 1 d after acidosis and remained very low the remainder of the time, which may also help to explain the increase in butyrate concentration. On the other hand, *Butyrivibrio fibrisolvens*, also a major butyrate-producing bacterium (Stewart et al., 1997), did not bring conclusive results in this experiment because it had an heterogeneous response (Table 7).

Four days after acidosis most of the fermentation parameters (total VFA, propionate, butyrate, acetate to propionate ratio, pH), DMI and DGGE microbial profile recovered to initial values. Cluster analysis comparing the d 10 of adaptation, acidosis day and 4 d after acidosis generated an UPGMA dendrogram (Figure 1) which revealed that the clusters of d 10 of adaptation and 4 d after acidosis were closer to each other than with the day of acidosis. This could be explained by the change to a 50:50 forage:concentrate diet the day after acidosis.

Effects of PAP on ruminal fermentation

During the adaptation period, with a 100% forage diet, no significant differences between treatments were observed for total VFA (112.1 ± 4.11 mM), acetate (71.1 ± 0.38 mol/100 mol), propionate (17.1 ± 0.47 mol/100 mol), butyrate (9.64 ± 0.206 mol/100 mol), acetate to propionate ratio (4.18 ± 0.133) and lactate (1.24 ± 0.412 mM). On d 10 of adaptation, heifers fed CTR had greater pH than those fed PAP (7.02 and 6.78 ± 0.063 , respectively), but this difference is not relevant in practice. Lack of effect of treatments during adaptation was expected because *S. bovis*, the major target bacteria for the PAP, plays a greater role in high-concentrate diets.

At the end of the induction period 83.3% and 50% of the animals entered into acidosis in CTR and PAP, respectively, but this difference was not significant perhaps due to the small number of animals in the experiment. On average it took 5.4 and 5.0 d for heifers in CTR and PAP, respectively, to enter acidosis.

During the trial, heifers treated with PAP had greater pH values at 0 h post-feeding on days 6 (6.70 vs 6.11), 8 (6.54 vs 5.95) and 9 (7.26 vs 6.59) after the start of the feeding challenge compared with CTR (Figure 2). However, total VFA concentration tended to be greater in PAP-treated heifers (124.4 and 114.3 ± 3.96 mM, respectively; Table 4).

Other studies also observed an increase of ruminal pH in animals treated with passive (DiLorenzo et al., 2006, 2008) and active immunization (Gill et al., 2000; Shu et al., 2000). In contrast, DiLorenzo et al. (2005) did not observe effect of PAP on average ruminal pH. However, these studies were conducted with animals adapted to a high-concentrate diet instead of a challenge feeding from forage to concentrate diet like the present study.

There were no differences between treatments in DMI and lactate concentration (Table 2 and 3, respectively). This results agree with those reported by DiLorenzo et al. (2005), but disagree with some studies with active immunization against *S. bovis* (Gill et al., 2000; Shu et al., 2000), which reported an increase in DMI and a lower L-lactate concentration in vaccinated animals. However, lactate values exceeding 20 mM (n = 2) were only reported in CTR heifers.

Numerically, the DNA concentration of lactate-producing bacteria (*S. bovis*) was greater in CTR than in PAP (91.6 ± 53.9 and 49.5 ± 10.5 ng/mL ruminal fluid, respectively; Table 5), but differences were not significant due to large animal to animal variation. The maximum value of *S. bovis* DNA concentration occurred 1 and 4 d after acidosis in CTR and in PAP-treated heifers, respectively (Table 5). In most cases, DiLorenzo et al. (2006, 2008) observed reductions in *S. bovis* counts with PAP doses between 2.5 and 7.5 mL per animal and day. It is not clear why in this experiment (10 mL dose) PAP did not affect ruminal *S. bovis* DNA content, but it could be due to a phenomenon of antibody-to-antibody agglutination at greater antibody titers (DiLorenzo et al., 2006).

4. Conclusions

The multivalent polyclonal antibody preparation may be effective in reducing the incidence of acidosis during transition from a high-forage diet to a high grain diet. Nevertheless, there were no major differences in fermentation and microbial profile between acidotic animals in both treatments. Further studies with more animals are necessary to confirm these results.

Table 1. Primers, probes and PCR conditions used in this study.

Target	Sequence (5'3')	Annealing T ^a	Fw ¹ μM	Rv ² μM	Probe μM	MgCl ₂ mM	Reference
<i>Streptococcus bovis</i>	Fw. ATGTTAGATGCTTGAAAGGAGCAA Rv. CGCCTTGGTGAGCCGTTA P ³ . CTCACCAACTAGCTAATACAACGCAGGTCCA	60	1	1	0.25	3	Klieve et al. (2003)
<i>Megasphaera elsdenii</i>	Fw. GACCGAAACTGCGATGCTAGA Rv. CGCCTCAGCGTCAGTTGTC P. TCCAGAAAGCCGCTTTCGCCACT	60	0.25	0.25	0.5	3	Ouwerkerk et al. (2002)
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> SA ⁴	Fw. TCCGGTGGTATGAGATGGGC Rv. GTCGCTGCATCAGAGTTTCCT P.	55	0.4	0.8	0.2	3	Paillard et al. (2007)
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> VA ⁵	Fw. GCCTCAGCGTCAGTAATCG Rv. GGAGCGTAGGCGGTTTTAC	65	0.4	0.4		3.5	Paillard (unpublished data)
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> Atypical	Fw. GACGGTGTATCAAGTCTGAAGTG Rv. GCCGGCACTGAAAGACTATGTC	65	0.25	0.25		3.5	Paillard (unpublished data)

¹Fw = forward primer.

²Rv = reverse primer.

³P = probe.

⁴SA = stearic acid producer.

⁵VA = vaccenic acid producer.

Table 2. Effects around onset of acidosis and treatment with a multivalent polyclonal antibody preparation on voluntary feed intake in crossbred heifers.

Item	Day					Treatment ¹			P-value ^{2,3}	
	3 d before	1 d before	Day of acidosis	1 d after	4 d after	CTR	PAP	SEM ⁴	D	T
Concentrate DMI, kg/d	5.40 ^b	9.17 ^a	8.88 ^a	2.76 ^c	4.88 ^b	6.09	6.35	0.580	***	NS
Fescue hay DMI, kg/d	5.17 ^a	3.52 ^b	1.93 ^c	3.72 ^b	5.15 ^a	3.91	3.89	0.319	***	NS
Total DMI, kg/d	10.6 ^b	12.7 ^a	10.8 ^a	6.46 ^c	10.0 ^b	10.0	10.2	0.639	***	NS
Concentrate, %	50.4 ^b	72.4 ^a	81.0 ^a	38.0 ^b	49.0 ^b	57.7	58.6	3.77	***	NS

^{a,b,c}Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

¹CTR = control (n = 5); PAP = polyclonal antibody preparation (n = 3).

²D = day effect; T = treatment effect.

³NS = $P > 0.05$, *** $P < 0.001$.

⁴SEM = standard error of the means.

Table 3. Effects around onset of acidosis, hours post-feeding and treatment with a multivalent polyclonal antibody preparation on ruminal pH and lactate in crossbred heifers.

Item	Hour ¹		Treatment ²		SEM ⁵	P-value ^{3,4}	
	0	6	CTR	PAP		H	T
Ruminal pH							
3 days before acidosis	7.42 ^a	6.25 ^{ab}	6.89 ^a	6.78 ^a	0.149	***	NS
1 day before acidosis	7.34 ^a	6.46 ^a	7.02 ^a	6.78 ^a	0.063	***	*
Day of acidosis	6.13 ^b	5.54 ^c	5.96 ^b	5.71 ^b	0.127	*	NS
1 day after acidosis	6.18 ^b	5.91 ^{bc}	6.08 ^b	6.01 ^b	0.269	NS	NS
4 days after acidosis	7.32 ^a	6.55 ^a	6.88 ^a	6.99 ^a	0.216	**	NS
SEM	0.165	0.171	0.151	0.191			
Lactate, mM							
3 days before acidosis	2.29	0.291 ^e	1.01	1.57 ^{de}	0.5231	†	NS
1 day before acidosis	2.39	0.00 ^e	0.883	1.51 ^e	0.3702	**	NS
Day of acidosis	3.11	3.07 ^{de}	2.69	3.49 ^{de}	0.889	NS	NS
1 day after acidosis	9.06	4.35 ^d	9.90	3.50 ^{de}	4.284	NS	NS
4 days after acidosis	2.67	2.87 ^{de}	1.92	3.62 ^d	0.751	NS	NS
SEM	2.748	1.3198	2.1677	0.809			

^{a,b,c}Within a column, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

^{d,e}Within a column, means without a common superscript letter differ ($P < 0.10$).

¹0 h and 6 h post-feeding (n = 8).

²CTR = control (n = 5); PAP = polyclonal antibody preparation (n = 3).

³H = hour effect; T = treatment effect.

⁴NS = $P > 0.05$, † $P < 0.10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

⁵SEM = standard error of the means.

Table 4. Effects around onset of acidosis, hours post-feeding and treatment with a multivalent polyclonal antibody preparation on volatile fatty acids (VFA) in crossbred heifers.

Item	Hour ¹		Treatment ²		SEM ⁵	P-value ^{3,4}	
	0	6	CTR	PAP		H	T
Total VFA, mM							
3 days before acidosis	90.4 ^b	140.0 ^b	111.9 ^{bc}	118.5 ^b	5.31	***	NS
1 day before acidosis	92.9 ^b	125.3 ^b	102.0 ^{bc}	116.2 ^{bc}	4.16	***	†
Day of acidosis	135.4 ^a	163.8 ^a	140.6 ^a	158.6 ^a	7.70	*	NS
1 day after acidosis	125.8 ^a	132.5 ^{bc}	119.3 ^b	139.0 ^a	8.99	NS	NS
4 days after acidosis	84.0 ^b	114.8 ^c	97.9 ^c	100.8 ^c	7.38	*	NS
SEM	6.88	6.16	5.79	7.18			
Acetate, mol/100 mol							
3 days before acidosis	71.2 ^a	69.8 ^a	70.6 ^a	70.4 ^a	0.40	**	NS
1 day before acidosis	71.8 ^a	71.4 ^a	71.7 ^a	71.5 ^a	0.35	†	NS
Day of acidosis	64.7 ^b	61.3 ^c	62.8 ^c	63.1 ^b	1.37	*	NS
1 day after acidosis	62.5 ^b	61.5 ^c	63.0 ^c	60.9 ^b	2.84	NS	NS
4 days after acidosis	66.3 ^b	64.7 ^b	66.7 ^b	64.3 ^b	1.60	†	NS
SEM	1.66	1.00	1.14	2.06			
Propionate, mol/100 mol							
3 days before acidosis	16.7	17.7 ^b	17.0 ^b	17.4	0.48	***	NS
1 day before acidosis	16.7	17.2 ^b	16.5 ^b	17.4	0.37	*	NS
Day of acidosis	16.9	19.3 ^{ab}	18.0 ^{ab}	18.2	1.08	*	NS
1 day after acidosis	19.7	21.1 ^a	19.9 ^a	20.9	1.97	NS	NS
4 days after acidosis	18.9	18.4 ^b	17.9 ^{ab}	19.4	1.88	NS	NS
SEM	1.31	1.02	0.79	2.24			
Butyrate, mol/100 mol							
3 days before acidosis	9.47 ^{bc}	10.4 ^c	10.0 ^c	9.90 ^c	0.179	*	NS
1 day before acidosis	8.88 ^c	9.76 ^c	9.66 ^c	8.98 ^c	0.259	**	NS

Day of acidosis	15.5 ^a	16.6 ^a	16.3 ^a	15.9 ^a	1.22	NS	NS
1 day after acidosis	14.9 ^a	14.5 ^b	14.3 ^b	15.1 ^a	1.61	NS	NS
4 days after acidosis	11.6 ^b	14.0 ^b	12.6 ^b	13.0 ^b	0.63	*	NS
SEM	0.837	0.771	0.936	0.479			
Acetate:propionate ratio							
3 days before acidosis	4.28	3.96 ^{ab}	4.18 ^a	4.06	0.135	**	NS
1 day before acidosis	4.31	4.17 ^a	4.36 ^a	4.12	0.112	**	NS
Day of acidosis	3.91	3.21 ^b	3.53 ^b	3.58	0.269	*	NS
1 day after acidosis	3.52	3.09 ^b	3.31 ^b	3.30	0.502	NS	NS
4 days after acidosis	3.79	3.67 ^{ab}	3.86 ^{ab}	3.60	0.470	NS	NS
SEM	0.346	0.265	0.201	0.555			

^{a,b,c} Within a column, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

^{d,e} Within a column, means without a common superscript letter differ ($P < 0.10$).

¹0 h and 6 h post-feeding (n = 8).

²CTR = control (n = 5); PAP = polyclonal antibody preparation (n = 3).

³H = hour effect; T = treatment effect.

⁴NS = $P > 0.05$, [†] $P < 0.10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

⁵SEM = standard error of the means.

Table 5. Effects around onset of acidosis, hours post-feeding and treatment with a multivalent polyclonal antibody preparation on quantification of *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii* in crossbred heifers.

Item	Hour ¹		Treatment ²		SEM ⁵	P-value ^{3,4}	
	0	6	CTR	PAP		H	T
<i>S. bovis</i> ⁶							
100% forage diet ⁷	16.3	11.3	12.7	15.0 ^b	2.27	**	NS
Day of acidosis	25.4	28.8	26.8	27.4 ^b	9.80	NS	NS
1 day after acidosis	29.2	78.5	91.6	16.1 ^b	53.9	NS	NS
4 days after acidosis	41.8	33.8	26.2	49.5 ^a	10.5	NS	NS
SEM	8.55	34.57	26.44	10.16			
<i>M. elsdenii</i> ⁶							
100% forage diet ⁷	ND ⁸	ND	ND	ND	-	-	-
Day of acidosis	13.8	2.27	15.8	0.206	13.8	NS	NS
1 day after acidosis	83.0	104.1	37.2	150.0	72.6	NS	NS
4 days after acidosis	7.60	2.79	0.708	9.69	4.19	NS	NS
SEM	25.1	31.1	14.9	51.7			

^{a,b}Within a column, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

¹0 h and 6 h post-feeding (n = 8).

²CTR = control (n = 5); PAP = polyclonal antibody preparation (n = 3).

³H = hour effect; T = treatment effect.

⁴NS = $P > 0.05$, ** $P < 0.01$.

⁵SEM = standard error of the means.

⁶ng DNA/mL ruminal fluid.

⁷Samples were taken the day 10 of adaptation.

⁸ND = not detected.

Table 6. Effects around onset of acidosis, hours post-feeding and treatment with a multivalent polyclonal antibody preparation on protozoa counts in crossbred heifers.

Item	Hour ¹		Treatment ²		SEM ⁵	P-value ^{3,4}	
	0	6	CTR	PAP		H	T
<i>Entodiniomorphs</i> , log ₁₀							
100% forage diet ⁶	5.18 ^{ab}	4.85 ^b	5.00 ^{bc}	5.03 ^{bc}	0.066	***	NS
Day of acidosis	5.27 ^{ab}	5.24 ^a	5.18 ^{ab}	5.33 ^{ab}	0.163	NS	NS
1 day after acidosis	5.02 ^{bc}	4.82 ^b	4.95 ^{cd}	4.90 ^c	0.199	†	NS
4 days after acidosis	5.49 ^a	5.28 ^a	5.32 ^a	5.44 ^a	0.127	*	NS
SEM	0.110	0.117	0.100	0.145			
<i>Holotrichs</i> , log ₁₀							
100% forage diet ⁶	4.04 ^a	3.24	3.87 ^a	3.42	0.408	NS	NS
Day of acidosis	3.70 ^a	3.98	4.13 ^a	3.56	0.164	NS	*
1 day after acidosis	3.60 ^a	3.23	3.37 ^b	3.45	0.344	NS	NS
4 days after acidosis	3.83 ^a	3.67	3.86 ^a	3.65	0.186	NS	NS
SEM	0.317	0.360	0.261	0.459			

^{a,b,c,d}Within a column, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

¹0 h and 6 h post-feeding (n = 8).

²CTR = control (n = 5); PAP = polyclonal antibody preparation (n = 3).

³H = hour effect; T = treatment effect.

⁴NS = $P > 0.05$, † $P < 0.10$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

⁵SEM = standard error of the means.

⁶Samples were taken the day 10 of adaptation.

Table 7. Effect around onset of acidosis, hours post-feeding and treatment with multivalent polyclonal preparation on quantifications of three stirpes of *Butyrivibrio fibrisolvens* (**B.f.**) in crossbred heifers.

Item	Hour ¹		Treatment ²		SEM ⁵	P-value ^{3,4}	
	0	6	CTR	PAP		H	T
<i>B.f.</i> SA ⁶⁷							
100% forage diet ⁸	277.8 ^b	253.9 ^b	286.0 ^{bc}	245.7 ^b	70.1	NS	NS
Acidosis day	519.8 ^b	189.5 ^b	515.1 ^{ab}	194.2 ^b	120.9	†	NS
1 day after	342.5 ^b	100.8 ^b	216.0 ^c	227.4 ^b	105.7	NS	NS
4 days after	1378 ^a	971.2 ^a	658.0 ^a	1691 ^a	400.4	NS	NS
Average	613.0	350.1	429.4	568.4	84.8	†	NS
SEM	204.8	138.4	90.1	300.7			
<i>B.f.</i> VA ⁷⁹							
100% forage diet ⁸	17.1	10.1	16.0 ^b	11.1	4.55	NS	NS
Acidosis day	98.0	24.1	107.4 ^a	14.6	36.2	†	NS
1 day after	69.2	16.1	41.0 ^b	44.3	20.8	†	NS
4 days after	45.9	31.7	24.4 ^b	53.2	15.9	NS	NS
Average	59.4	19.2	42.2	34.4	10.6	**	NS
SEM	25.5	11.1	19.4	17.7			
<i>B.f.</i> atypical ⁷							
100% forage diet ⁸	34.2 ^c	37.0 ^b	36.0 ^{bc}	35.3 ^b	10.5	NS	NS
Acidosis day	64.0 ^{bc}	8.52 ^c	56.6 ^{ab}	15.9 ^b	14.8	*	NS
1 day after	39.9 ^{bc}	8.37 ^c	18.6 ^c	29.7 ^b	10.1	*	NS
4 days after	77.6 ^b	60.5 ^a	56.3 ^{ab}	81.7 ^a	12.0	NS	NS
Average	68.1	30.3	49.6	48.7	7.02	***	NS
SEM	15.3	7.03	11.2	13.7			

^{a,b,c}Within a column, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

¹0 h and 6 h post-feeding (n = 8).

²CTR = control (n = 5); PAP = polyclonal antibody preparation (n = 3).

³H = hour effect; T = treatment effect.

⁴NS = $P > 0.05$, [†] $P < 0.10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

⁵SEM = standard error of the means.

⁶SA = stearic acid producer.

⁷ ng DNA/mL ruminal fluid.

⁸Samples were taken the day 10 of adaptation.

⁹VA = vaccenic acid producer.

Figure 1. Cluster analysis results of the DGGE profiles demonstrated graphically as an UPGMA dendrogram comparing the day 10 of adaptation, acidosis day and 4 days after acidosis.

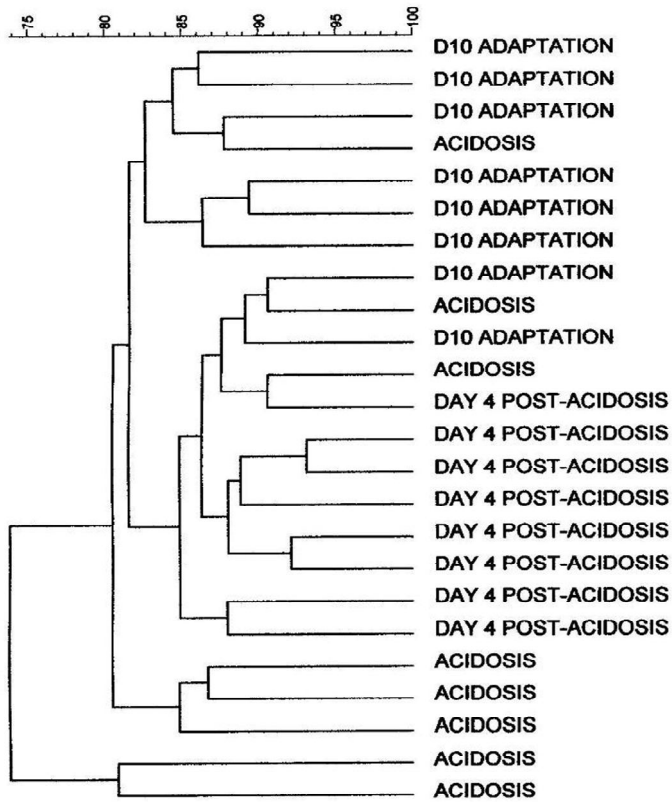
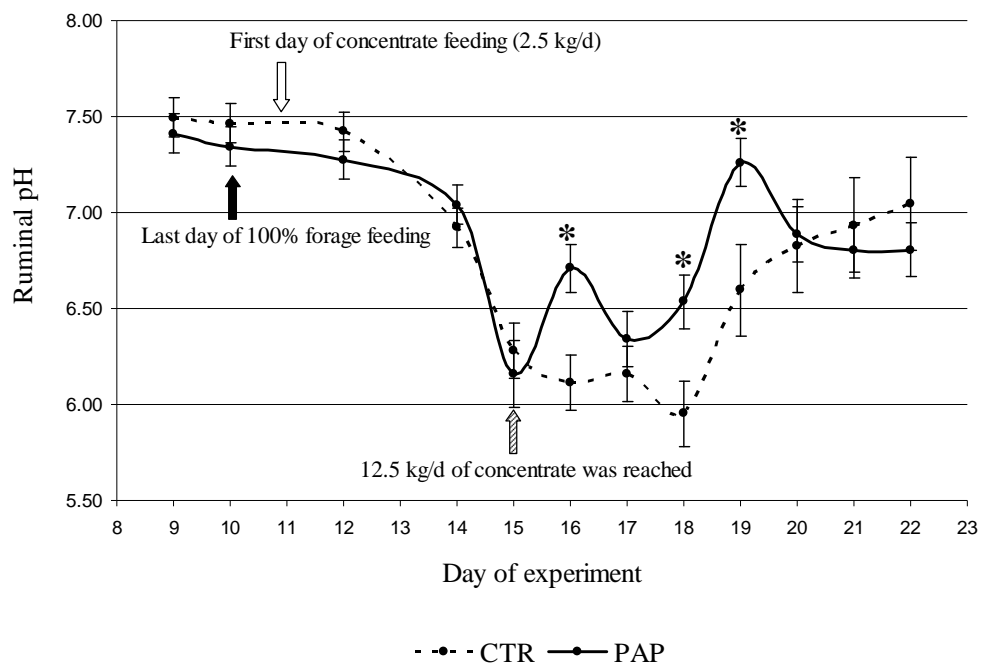


Figure 2. Ruminal pH at 0 h post-feeding in control (**CTR**) and multivalent polyclonal preparation group (**PAP**) during all the experiment.



CAPÍTULO 5

Experimento 4:

Effects of an amylase inhibitor (acarbose) on ruminal fermentation and animal metabolism in lactating cows fed a high-carbohydrate ration.

Effects of an amylase inhibitor (acarbose) on ruminal fermentation and animal metabolism in lactating cows fed a high-carbohydrate ration.

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effects of an amylase inhibitor (acarbose, Pfizer Limited, Corby, UK) in dairy cows in a 2x2 cross-over experiment. Eight Holstein cows fitted with a rumen cannula (milk yield = 24.3 ± 2.35 kg/d, BW = 622 ± 54 kg, DIM = 183 ± 67 , 5 multiparous and 3 primiparous) were used to study animal metabolism and ruminal fermentation. Treatments were: control (no additive, **CTR**) and amylase and glucosidase inhibitor (0.75 g acarbose-premix/cow/d, **AMI**). Animals were fed a high non-fiber carbohydrates (**NFC**) partial mixed ration (**PMR**, 17.6% CP, 28.3% NDF, and 46.5% NFC, based DM) and concentrate during milking. Animals were blood sampled to determine blood glucose, insulin, and urea within the first hour after the morning feeding in 2 separate days in each period. Samples of ruminal contents were collected during 3 d in each period at 0h, 4h and 8h post-feeding to determine volatile fatty acid and ammonia N concentrations, quantification of protozoa, *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii*. Rumen pH was recorded electronically at 22-min intervals during 6 d in each period. Data were analyzed using a mixed-effects model. Differences were declared at $P < 0.05$. Cows on AMI treatment spent less hours below pH = 5.6 compared with CTR group (2.44 and 6.47 ± 1.113 h/d, respectively) and AMI had greater daily average pH compared with CTR (6.05 and 5.92 ± 0.042 , respectively). AMI animals tended ($P = 0.09$) to have lower *S. bovis* to *M. elsdenii* ratio than CTR (4.09 and 26.8 ± 12.0 , respectively). These results indicate that supplementing diets with acarbose to dairy cattle fed high-yielding rations may be effective in reducing acidosis in lactating cows with no negative effects on ruminal fermentation and animal metabolism.

Key words: acarbose, amylase inhibitor, dairy cows, ruminal acidosis.

1. Introduction

Ruminal acidosis is one of the most common nutritional disorders in feedlot and dairy cattle, and its economic impact was estimated to be \$US 500 to 1000 million each year (Stone, 1999). High producing dairy cows require large amounts of high energy feeds to

meet nutritional requirements for maintenance, milk synthesis and reproduction. These energy requirements are often met by increasing non-fiber carbohydrates (**NFC**) in the diet, which are mainly composed by starch (Van Soest et al., 1991). Starch is highly broken down by alpha-amylases and the resulting glucose is rapidly fermented by rumen bacteria increasing the production of volatile fatty acids (**VFA**) and occasionally lactate, thereby increasing the risk of rumen acidosis. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors are used as anti-diabetic drugs in humans because they inhibit enzymes needed to digest carbohydrates (especially alpha-amylases that hydrolyse complex starches to glucose). Inhibition of these enzyme systems should lengthen digestion of complex carbohydrates (Puls et al., 1977). Some studies tested the effect of different carbohydrase inhibitors on rumen fermentation using in vitro experiments, and reported that acarbose (an amylase and glucosidase inhibitor) increased pH and decreased lactate concentration in the media (Speight and Harmon, 2005; Speight et al., 2007). These results suggested that acarbose could prevent ruminal acidosis and also increase the amount of starch available in the intestine. The objective of this experiment was to study the effects of acarbose in preventing ruminal acidosis in lactating cows fed a high-NFC ration.

2. Materials and Methods

Animals and treatments

Eight lactating Holstein dairy cows fitted with rumen cannula (milk yield = 24.3 ± 2.35 kg/d, BW = 622 ± 54 kg; DIM 183 ± 67 ; 5 multiparous and 3 primiparous) were used over a period of 2 mo. All cows were kept at the experimental research farm of the Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries in Monells (Girona, Spain) in loose housing conditions evenly distributed in 2 symmetrical pens. Cows were on straw bedding (replaced every 2 d) and milked with an automatic milking system (**AMS**: VMS, DeLaval, Tumba, Sweden). Animals were maintained and handled under the supervision of the Animal Care Committee of the Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries.

The experiment was a cross-over design with 2 periods (30 d each) and 2 treatments. Treatments consisted on a partial mixed ration (**PMR**): with no additive (**CTR**) or with 0.75 g acarbose-premix/cow/d (**AMI**, Pfizer Limited, Corby, UK). Acarbose premix contained 10% of acarbose on a soya bean hull carrier. Acarbose is an amylase and

glucosidase inhibitor. All cows received the same concentrate at the AMS and were fed the PMR twice daily. Ingredient and nutrient composition of PMR and concentrate are shown in Table 1.

Measurements and sample collection

Individual feed consumption was continuously monitored throughout the study using a computerized system (Bach et al., 2004). Fresh feed and refusal samples were collected daily and analyzed for DM to determine DMI. Animals were blood sampled to determine blood glucose, insulin, and urea concentrations within the first hour after the morning feeding in 2 separate days in each period. Samples of ruminal contents were collected during 3 d in each treatment at 0, 4 and 8 h post-feeding. Ruminal fluid was strained through 2 layers of cheesecloth, and 4 sub-samples of filtrate were taken for the determination of VFA, ammonia N, enumeration of protozoa, and DNA extraction for quantitative real time PCR (**qPCR**) of *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii*. Rumen pH was recorded electronically at 22-min intervals during 6 d in each treatment.

Chemical analyses

Feed DM was determined by oven drying at 105 °C for 24 h (AOAC, 1990; ID 950.01) and ashes by heating the feed at 550 °C for 4h (AOAC, 1990; ID 942.05). Dietary NDF and ADF contents were analyzed by the detergent system, using the sequential procedure described by Van Soest et al. (1991), with sodium sulphite, a thermostable amylase, and correcting for ashes.

Enzymatic determination of serum glucose and urea were conducted following the HK/G-6-PDH method (Burrin and Price, 1985) and the urease-GLDH method (Gutmann and Bergmeyer, 1974), respectively. Serum insulin was determined using ELISA (Mercodia, Uppsala, Sweden).

Total and individual VFA were prepared as described by Jouany (1982) and analyzed by gas chromatography: 1 mL of a solution made up of 0.2% solution of mercuric chloride, 0.2% of 4-methylvaleric acid as an internal standard, and 2% orthophosphoric acid, was added to 4 mL of filtered rumen fluid and frozen at -20 °C. Samples were centrifuged at 15,000 x g for 15 min at 7 °C, and the supernatant was analyzed by gas

chromatography (model 6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using polyethylene glycol nitroterephthalic acid-treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., Buckinghamshire, UK) at 275 °C in the injector and 29.9 mL/min gas flow rate.

Ammonia N concentration was analyzed as described by Chaney and Marbach (1962): 4 mL sample of filtered rumen fluid was acidified with 4 mL of 0.2 N HCl and frozen at -20 °C. Samples were centrifuged at 15,000 x g for 15 min, and the supernatant analyzed by spectrophotometry (Libra S21, Biochrom Analytical Instruments, Cambridge, UK).

For enumeration of protozoa, 1 mL of filtered rumen fluid was mixed with 9 mL of methyl green:formaldehyde (38% wt/wt) solution. Entodiniomorphs and holotrichs were identified (Dehority, 1993) and counted as described by Veira et al. (1983) using a Neubauer Improved Bright-Line counting chamber (Hauser Scientific Partnership, Horsham, PA). Protozoa counts were transformed to a base 10 logarithm before statistical analysis.

For DNA extraction, rumen fluid samples were aliquoted in sterile eppendorfs of 1.5 mL and frozen at -20 °C. The DNA from rumen fluid samples was extracted by physical disruption using a bead-beating method (Mini-Beater; Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) following the protocol described by Whitford et al. (1998) with some modifications (Blanch et al., 2007). For qPCR, primers and probes used in this study are listed in Table 2. All samples were run in triplicate for standard curve points or in duplicate for ruminal samples in a 20 µL reaction volume containing 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), primers at a final concentration of 900 nM each, 250 nM probe, and 100 ng of genomic DNA (5 µL of ruminal fluid samples at 20 ng/µL). The PCR was run in the ABI PRISM[®] 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) using optical grade 96 well-plates using the following amplification parameters: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, and 40 cycles of 15s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Reactions without DNA were always used as negative controls in each run.

Statistical Analyses

Intake data were summarized by week. For blood metabolites (insulin, glucose, and urea), the average within animal and period was used for the analysis. For rumen data (VFA, ammonia N, qPCR, and protozoa counts), the average among days at each sampling time with animal and treatment was used for the analyses. For rumen pH, the average with animal and treatment of each day was used for the analyses. All statistical analyses were conducted using PROC MIXED of SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA, version 8.2). Period was considered a random effect in all analyses. The degrees of freedom were corrected by Satterth's optimization. The statistical model included treatment, sequence in the cross-over, stage of lactation, time, parity, and the interactions of treatment with parity and treatment with stage of lactation (the last one only if it was significant). The stage of lactation of each cow was classified as a 4-class ordinal variable using the quartiles of the DIM distribution as cutoffs when the interaction treatment by stage of lactation was significant. Intake and all rumen data were analyzed using PROC MIXED for repeated measures (Littell et al., 1998) using the Compound Symmetry structure.

3. Results and discussion

Total, PMR and concentrate intake, and milk yield were not affected by treatment (Table 3). Some authors reported a negative effect of acarbose on DMI in rats, in a dose-dependent manner, and it was hypothesised that the presence of incompletely digested food in the digestive tract could inhibit feed intake (Vedula et al., 1991; Ramirez, 1992). No differences on blood metabolites (glucose, insulin, and urea) were observed between treatments (Table 3), indicating that AMI did not affect general animal metabolism.

The hypothetical mechanism of action of acarbose is the lengthening of starch digestion, decreasing starch digestion in the rumen and increasing starch digested in the intestine (Speight and Harmon, 2005; Speight et al., 2007). Therefore, if a lesser amount of starch is digested in the rumen of animals receiving AMI, then a decrease in VFA production in the rumen of animals receiving AMI compared with CTR could be expected. However, no changes in total VFA concentration and VFA profile were observed between treatments (Table 4). Despite the lack of differences in VFA, acarbose increased ruminal average pH and decreased the number of hours at pH below 5.6 compared with control (Table 4). The evolution of rumen pH during the day is

presented in Figure 1. Changes observed in pH were likely related to a modification in the microbial profile. The decrease in pH could be a consequence of lactate accumulation in the rumen. *Streptococcus bovis* is a starch utilizer and a main lactic acid producer in the rumen, and *M. elsdenii* is a main lactic acid utilizer (Counotte et al., 1981). No changes in *S. bovis* quantification were observed between treatments, but *M. elsdenii* quantification tended ($P = 0.12$) to increase with AMI, and the *S. bovis* to *M. elsdenii* ratio tended ($P = 0.09$) to be lower in AMI compared with CTR (Table 5). These results indicate that a decrease in lactic acid concentration as a consequence of an increase of lactate uptake by *M. elsdenii* could be responsible for the increase in rumen pH observed with AMI. Moreover, rumen entodiniomorphs and holotrichus counts tended ($P = 0.12$ and $P = 0.06$, respectively) to be lower in AMI compared with CTR. Protozoa phagocyte starch very rapidly (Williams and Coleman, 1988) and compete with amylolytic bacteria for their substrate (Newbold et al., 1987; Owens et al., 1998), thus a decrease of protozoa counts suggests that acarbose might also inhibit the amylase activity of protozoa in the rumen.

4. Conclusions

The decrease in the number of hours at ruminal pH below 5.6 and the increase in the average rumen pH in the cows that received an amylase inhibitor indicated that acarbose could be a potential alternative against ruminal acidosis.

Table 1. Ingredient and nutrient composition of the experimental diet.

	PMR ¹	Concentrate ²
Ingredient composition, % DM		
Corn silage	50.3	-
Corn	23.7	50.0
Whole cotton seed	3.08	-
Soybean meal	11.7	-
Corn gluten feed	2.46	50.0
Soybean hulls	4.62	-
Wheat midds	3.29	-
Calcium carbonate	0.34	-
Magnesium oxide	0.12	-
Salt	0.18	-
Vitamin-mineral premix ¹	0.15	-
Nutrient composition		
CP, %	17.6	16.7
NDF, %	28.3	22.6
ADF, %	15.8	7.78
NFC, %	46.5	54.9
EE, %	3.99	3.85
Net energy, Mcal of NE _L /kg	1.68	1.77

¹PMR = partial mixed ration.

²Concentrate offered during milking.

Table 2. Primers, Taqman probes-MGB, and PCR conditions used in this study.

Target	Sequence (5'3')	Ann. T ^{a1}	Fw ² μM	Rv ³ μM	Probe μM	Reference
<i>Streptococcus bovis</i>	Fw. GATAGCTAATACCGCATAACAGCATT	60	0.9	0.9	0.25	Blanch et al., 2007
	Rv. AACGCAGGTCCATCTACTAGTGAA					Blanch et al., 2007
	P ⁴ . TGCTCCTTTCAAGCAT					Blanch et al., 2007
<i>Megasphaera elsdenii</i>	Fw. GACCGAAACTGCGATGCTAGA	60	0.9	0.9	0.25	Ouwerkerk et al., 2002
	Rv. CGCCTCAGCGTCAGTTGTC					Ouwerkerk et al., 2002
	P. ACTGGTGTTTCCTCCTAATA					Blanch et al., 2007

¹Ann. T^a = annealing temperature.

²Fw = forward primer.

³Rv = reverse primer.

⁴P = probe.

Table 3. Effect of an amylase inhibitor on dry matter intake, milk yield, and blood parameters.

	CTR ¹	AMI ²	SEM ³	<i>P</i> – value ⁴
Total DMI, kg/d	22.3	21.8	1.38	NS
PMR intake, kg/d	20.7	20.0	1.55	NS
Concentrate intake, kg/d	1.62	1.77	0.224	NS
Milk yield, kg/d	25.5	23.1	2.35	NS
Glucose, mmol/L	3.67	3.65	0.096	NS
Insulin, µg/L	0.869	0.804	0.127	NS
Urea, mg/dL	31.6	32.6	2.69	NS

¹CTR = control.

²AMI = amylase inhibitor.

³SEM = standard error of the means.

⁴NS = *P* > 0.05.

Table 4. Effect of an amylase inhibitor on volatile fatty acids (VFA), ammonia N, and ruminal pH.

	CTR	AMI	SEM ³	P – value ⁴
Total VFA, mM	137.0	134.3	5.09	NS
Acetate, mol/100 mol	58.7	59.1	1.46	NS
Propionate, mol/100 mol	25.2	24.2	1.78	NS
Butyrate, mol/100 mol	12.6	12.5	0.908	NS
Acetate:Propionate	2.47	2.54	0.216	NS
Branched-chain VFA, mM	2.78	3.51	0.370	†
Ammonia N, mg/100 dL	11.6	11.0	0.807	NS
Number of hours pH < 5.6	6.47	2.44	1.113	**
Average pH	5.92	6.05	0.042	*

¹CTR = control.

²AMI = amylase inhibitor.

³SEM = standard error of the means.

⁴NS = $P > 0.05$, † $P < 0.10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Table 5. Effect of an amylase inhibitor on microbial profile.

	CTR ¹	AMI ²	SEM ³	P – value ⁴
<i>Streptococcus bovis</i> , ng/mL RF	35.9	63.3	15.5	NS
<i>Megasphaera elsdenii</i> , ng/mL RF	15.6	312.1	124.9	‡
<i>S. bovis</i> to <i>M. elsdenii</i> ratio	26.8	4.09	12.0	†
Entodiniomorphs, log ₁₀	5.44	4.71	0.336	‡
Holotrichus, log ₁₀	3.59	3.10	0.166	†

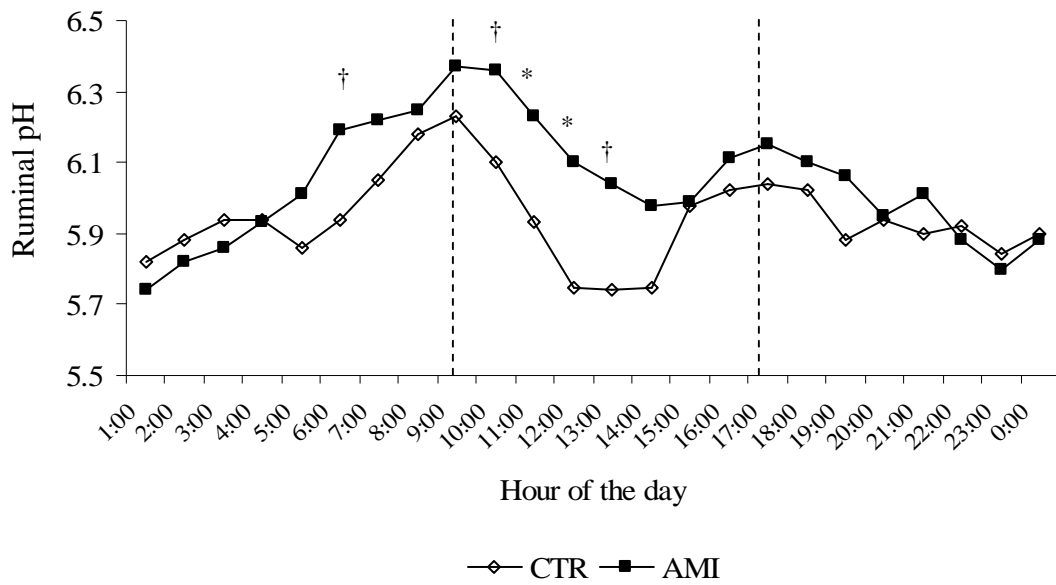
¹CTR = control.

²AMI = amylase inhibitor.

³SEM = standard error of the means.

⁴NS = $P > 0.05$, † $P < 0.10$, ‡ $P < 0.15$.

Figure 1. Ruminal pH evolution during the day in control (CTR) and amylase inhibitor group (AMI): (---) time of feeding, (*) $P < 0.05$, (†) $P < 0.10$.



CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN GENERAL

1. Introducción

Este capítulo se estructura en cuatro partes. En primer lugar, se intenta explicar la motivación que llevó al presente trabajo y la justificación cronológica de los estudios presentados. En segundo lugar, se han utilizado los resultados obtenidos en los 4 experimentos para desarrollar ecuaciones de predicción para conocer los parámetros que más influyen sobre el pH ruminal medio y el lactato. En tercer lugar, se discute sobre las nuevas alternativas probadas en esta tesis para prevenir la acidosis ruminal. Y finalmente, se ha introducido un apartado con reflexiones sobre algunos aspectos que han surgido a lo largo de la tesis. Sin embargo, en esta discusión no se ha querido entrar en detalles sobre los resultados específicos de cada trabajo porque ya han sido discutidos ampliamente en los capítulos anteriores.

2. Justificación del trabajo

La acidosis ruminal es uno de los trastornos alimentarios más comunes en vacuno, y causa cada año importantes pérdidas económicas en el sector. Consecuentemente, el estudio de la acidosis ruminal es una de las principales líneas de investigación de nuestro grupo (*Servei de Nutrició i Benestar Animal* de la Universitat Autònoma de Barcelona). Los trabajos realizados anteriormente a este proyecto estudiaron el efecto del pH y sus fluctuaciones sobre la fermentación ruminal, y para ello se utilizaron fermentadores de doble flujo continuo (Calsamiglia y col., 2008; Cerrato-Sánchez y col., 2007a,b, 2008). Con esta tesis, se quiso dar un paso más adelante, y abordar el tema desde un punto de vista más aplicado, es decir, estudiar el proceso de la acidosis *in vivo*. El proyecto inicial se estructuró en dos fases:

En la fase I se pretendía profundizar en el estudio de la acidosis ruminal. Para ello, se propuso poner a punto una técnica que permitiera estudiar las especies bacterianas involucradas en la acidosis ruminal. Dentro de la gran variedad de métodos que existen para estudiar la microflora ruminal (Anexo 1), se optó por la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (**qPCR**), una técnica que permite cuantificar microorganismos con alta especificidad y sensibilidad. La acidosis es un problema que se presenta tanto en vacas lecheras como en vacuno de engorde, por lo que, para validar la técnica, se utilizaron muestras de líquido ruminal de ambos animales. Finalmente, se desarrollaron

2 qPCR de bacterias involucradas en la síntesis y utilización del ácido láctico, una para *Streptococcus bovis* y la otra para *Megasphaera elsdenii*, respectivamente, con unas eficiencias del 88% y 99%, respectivamente. Esta técnica fue utilizada en todos los experimentos posteriores. Seguidamente se quiso progresar en algunos aspectos de la acidosis tanto en vacas en lactación como en vacuno de engorde. Por un lado, se estudió el efecto de administrar una dieta con altos niveles de carbohidratos no fibrosos (CNF) en vacas lecheras, ya que existen muy pocos trabajos que evalúen los efectos de niveles de inclusión superiores al 40% (Minor y col., 1998; Rabelo y col., 2003; Beckman y Weiss, 2005). La dieta alta en CNF incrementó la producción de leche y el contenido en proteína de ésta, pero resultó con algunos efectos negativos sobre el animal (disminución del contenido de grasa de la leche y del pH ruminal, y un aumento del riesgo de padecer laminitis). Y, por otro lado, se estudiaron los cambios fisiológicos y de fermentación ruminal durante una transición rápida de una dieta forrajera a una dieta concentrada en terneras, ya que existen pocos trabajos descriptivos al respecto (Goad y col., 1998; Coe y col., 1999; Bevans y col., 2005). Al final de este periodo, el 66,7% de los animales entraron en acidosis, presentando cambios en el perfil de fermentación y en la microflora ruminal, observados en su mayoría el día de la acidosis y el día posterior a ésta, respectivamente.

En la fase II se evaluaron nuevas estrategias de prevención de la acidosis ruminal, ya que ninguna de las alternativas existentes actualmente es completamente eficaz. Y para ello se probaron dos nuevos aditivos alimentarios y, siguiendo con el esquema anterior de estudiar la acidosis en lactación y en engorde, se estudió una de las alternativas en vacuno de carne (inmunización pasiva contra *S. bovis*) y la otra en vacas lecheras (inhibidor de la α -amilasa). En la última década, han aparecido varios estudios de inmunización activa, mediante vacunación frente a bacterias involucradas en el desarrollo de la acidosis ruminal (Shu y col., 1999; Gill y col., 2000; Shu y col. 2000) y, más recientemente, de inmunización pasiva mediante preparaciones de anticuerpos administrados con la dieta (DiLorenzo y col., 2006, 2008). Esta alternativa es muy innovadora y atractiva, pero la información disponible es limitada. El experimento de inmunización de terneras con una preparación de anticuerpos multivalentes policlonales aumentó puntualmente el pH ruminal y redujo el número de animales que entraron en acidosis. Por otra parte, la administración de dietas con altos contenidos en CNF aumenta el riesgo de acidosis en vacas en lactación, disminuyendo el pH debido a la

degradación rápida de estos compuestos en el rumen (principalmente almidón). Los principales responsables de la digestión del almidón son las α -amilasas. Por consiguiente, un producto que ralentizara su actividad podría ser eficaz para prevenir la acidosis, y este es el caso de los inhibidores de las carbohidrasas (Puls y col., 1977). Speight y Harmon (2005) examinaron *in vitro* ocho inhibidores de estas enzimas (acarbose, miglitol, glipizide, trestatin, Alpha-Trim W®, CarboTame®, starch blocker y wheat amylase inhibitor) sobre la fermentación ruminal, y sólo acarbose y trestatin modificaron el pH y los ácidos grasos volátiles, aumentándolo y disminuyéndolos, respectivamente. Posteriormente, Speight y col. (2007) probaron estos dos productos en fermentadores de flujo simple, y observaron que la acarbose fue la que presentó mejores respuestas, aumentando el pH, disminuyendo el lactato y aumentando el flujo de energía. Estos resultados obtenidos *in vitro* apuntaron a que la acarbose podía ser un producto interesante para prevenir la acidosis ruminal y aumentar la cantidad de almidón que llega al intestino sin digerir dónde su asimilación es más eficiente. Por lo tanto, el siguiente paso necesario era probarlo *in vivo*, siendo éste el objetivo del cuarto experimento (Capítulo 5). La administración de acarbose en vacas lactantes aumentó el pH medio y disminuyó el número de horas a pH inferior a 5,6.

3. Parámetros ruminales que afectan al pH ruminal medio

Cerrato-Sánchez (2007) constató que el impacto del pH sobre la fermentación ruminal depende del pH medio (PHM), del tiempo total por debajo de 6,0 y/o del área bajo la curva de pH 6,0. Al mismo tiempo, los análisis de regresión realizados con los tres parámetros sobre los cambios de fermentación ruminal resultaron en coeficientes de determinación (R^2) y errores de estimación similares. Además, los tres parámetros estaban altamente correlacionados entre ellos (Tabla 1). En la presente tesis, se escogió el PHM para realizar los análisis de regresión, al ser un parámetro fácil de determinar y, además, se disponía de este dato en los 4 experimentos realizados. En realidad, interesaba determinar cuáles de las variables ruminales estudiadas en este trabajo eran las que más afectan al PHM, aportando en los análisis parámetros novedosos como son las cuantificaciones de las principales bacterias involucradas en la acidosis ruminal.

Tabla 1. Coeficientes de determinación (R^2) entre los parámetros estudiados: el pH medio, el tiempo total por debajo de 6,0 y el área bajo la curva de pH 6,0 (Cerrato-Sánchez, 2007).

Parámetros	R^2
pH medio y área bajo la curva pH < 6,0	0,87
pH medio y tiempo total pH < 6,0	0,82
área bajo la curva y tiempo total pH < 6,0	0,71

Para detectar las variables ruminales que afectan en el PHM se utilizó el procedimiento de regresión *Stepwise*. Este procedimiento permite seleccionar automáticamente las variables significativas ($P < 0,15$), aportando el R^2 del modelo, como también el R^2 parcial de cada una de las variables. El R^2 mide la proporción de variabilidad total de la variable dependiente (en este caso, el PHM) respecto a su media que es explicada por el modelo de regresión; normalmente se multiplica este valor por cien y se expresa en forma de porcentaje. El R^2 parcial permite conocer la contribución parcial de cada una de las variables incluidas en el modelo. Para el desarrollo de los modelos de regresión se utilizaron los datos de los cuatro experimentos por separado, debido a las diferencias existentes entre ellos (tipo de animal, dieta, variables estudiadas, etc.). Asimismo, del experimento 1 se realizaron 2 modelos de regresión, uno para cada tipo de animal (vacas y terneras). El tamaño muestral de la base de datos utilizada fue de: $n = 48$ (Exp. 1 vacas), $n = 48$ (Exp. 1 terneras), $n = 48$ (Exp. 2), $n = 78$ (Exp. 3), $n = 96$ (Exp. 4).

Los modelos de regresión resultantes y los R^2 parciales de las variables seleccionadas se muestran en la Tabla 2 y 3, respectivamente. Por un lado, la Tabla 2 permite conocer qué variables se han incluido en el modelo y el signo que tienen, lo cual indica si están correlacionadas positiva o negativamente con el PHM. Por otro lado, la Tabla 3 muestra también las variables incluidas en el modelo y el peso específico de cada una de ellas. Los R^2 de los modelos fueron elevados, entre el 0,76 y el 0,88, lo cual significa que las variables seleccionadas explican en gran medida los cambios del PHM. Como se puede observar, la concentración de ácidos grasos volátiles (**AGV**) es la variable que más influye en el PHM en todos los modelos, explicando entre el 51,7 y el 74,1% de la variabilidad, y se observa una correlación negativa entre ambas variables.

Tabla 2. Modelos de regresión de pH ruminal medio.

Trabajo	Modelo ¹
Exp. 1 vacas	pH = 11,0 – 0,0098 AGV + 1,06 IBUT – 0,055 ACET – 0,029 SB – 0,59 VAL
Exp. 1 terneras	pH = 8,27 – 0,012 AGV + 0,0026 SB – 0,41 VAL + 0,0041 NH3 – 0,53 IBUT
Exp. 2 vacas	pH = 5,86 – 0,0095 AGV + 0,14 HOL + 0,02 ACET + 0,27 IBUT
Exp. 3 terneras	pH = 5,47 – 0,02 AGV – 0,00088 SB + 0,0078 NH3 + 0,52 IBUT – 0,022 LAC + 0,038 ACET
Exp. 4 vacas	pH = 7,21 – 0,0098 AGV + 0,81 IBUT – 0,099 IVAL + 0,0074 NH3 – 0,12 VAL – 0,011 BUT + 0,034 HOL

¹**AGV**: ácidos grasos volátiles (mM), **IBUT**: isobutírico (mol/100 mol), **ACET**: acético (mol/100 mol), **SB**: *Streptococcus bovis* (Exp. 1: ng DNA bacteria/100 ng DNA total. Exp. 3: ng DNA bacteria/mL líquido ruminal), **VAL**: valérico (mol/100 mol), **NH3**: nitrógeno amoniacal (mg/100 mL), **HOL**: holotricos (log₁₀), **LAC**: láctico (mM), **IVAL**: isovalérico (mol/100 mol), **BUT**: butírico (mol/100 mol).

Tabla 3. Coeficientes de determinación (**R**²) parciales de las variables incluidas en los modelos de regresión.

Variable ¹	Exp. 1 terneras	Exp. 1 vacas	Exp. 2 vacas	Exp. 3 terneras	Exp. 4 vacas
NH3	0,143	- ²	-	0,036	0,013
AGV	0,741	0,517	0,656	0,734	0,725
ACET	-	0,038	0,041	0,011	-
PROP	-	-	-	-	-
BUT	-	-	-	-	0,006
VAL	0,036	0,174	-	-	0,006
IBUT	0,009	0,158	0,013	0,027	0,078
IVAL	-	-	-	-	0,042
LAC	NE ³	NE	NE	0,022	ND
SB	0,052	0,030	-	0,050	-
ME	-	-	-	-	-
HOL	NE	NE	0,084	-	0,006
ENT	-	-	-	-	-
R ² modelo	0,852	0,761	0,794	0,880	0,875

¹ **NH3**: nitrógeno amoniacal (mg/100 mL), **AGV**: ácidos grasos volátiles (mM), **ACET**: acético (mol/100 mol), **PROP**: propiónico (mol/100 mol), **BUT**: butírico (mol/100 mol), **VAL**: valérico (mol/100 mol), **IBUT**: isobutírico (mol/100 mol), **IVAL**: isovalérico (mol/100 mol), **LAC**: láctico (mM), **SB**: *Streptococcus bovis* (Exp. 1: ng DNA bacteria/100 ng DNA total. Exp. 2, 3 y 4: ng DNA bacteria/mL líquido ruminal), **ME**: *Megasphaera elsdenii* (Exp. 1: ng DNA bacteria/100 ng DNA total. Exp. 2, 3 y 4: ng DNA bacteria/mL líquido ruminal), **HOL**: holotricos (log₁₀), **ENT**: entodiniomorfos. (log₁₀).

²-: Variable no incluida en el modelo (*p*-valor > 0,15).

³**NE**: variable no estudiada en el experimento.

Muchos autores coinciden con estos resultados, aunque en algunos de estos trabajos encontraron un R^2 mucho menor (Tabla 4). Probablemente, el trabajo de Sauvant y col. (1999) es uno de los más sólidos, porque incluye los resultados de 223 publicaciones y 945 lotes de animales experimentales. En este estudio el R^2 fue muy inferior (0,32) al obtenido en la presente tesis. El resto de variables incluidas en los modelos tiene una influencia mucho menor en el PHM, y difiere si se trata de terneras o vacas.

Tabla 4. Coeficientes de determinación (R^2) entre pH y concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) en varios estudios.

Autores	Nº trabajos	R^2 pH ruminal – AGV
Emmanuel y col., 1969	1	0,96
Burrin y Britton, 1986	1	0,33
Lana y col., 1998	1	0,73
Sauvant y col., 1999	223	0,32
Seymour y col., 2005	20	0,16
Tesis	4	0,71

En terneras, el segundo factor que más influye sobre el PHM, aunque muy modestamente, es la cuantificación de *S. bovis*. Esta variable aparece en los dos trabajos con terneras, con unos R^2 parciales alrededor del 0,05. Su efecto sobre el PHM no está muy claro, ya que en un modelo presenta una correlación positiva y, en el otro, negativa. En uno de los modelos de vacas (Exp. 4), en el que los animales recibían una dieta muy concentrada, también se introduce *S. bovis*, y esta variable presenta una correlación negativa. En realidad, biológicamente se esperaría una correlación negativa entre el PHM y *S. bovis*, al estar esta bacteria supuestamente relacionada con el desarrollo de la acidosis ruminal en dietas ricas en almidón, pero serían necesarios más estudios para corroborar estos resultados. Las otras variables incluidas en el modelo no tienen mucha transcendencia en el PHM, ya que sus R^2 parciales son inferiores al 0,05. Sin embargo, es interesante comentar la presencia del lactato en el único modelo en el que se analizó este parámetro, aunque con un R^2 parcial de 0,02. Burrin y Britton (1986) también observaron una correlación negativa muy baja entre el pH ruminal y concentración de lactato ($R^2 = 0,02$). Esta baja relación entre el lactato y el pH puede observarse en la Figura 1, donde se representa la relación entre el pH ruminal y la concentración de lactato, y en la cual se observa que no siempre que hay $\text{pH} < 5,8$ se

encuentran concentraciones altas de lactato (sólo alrededor del 10%), pero siempre que hay niveles altos de lactato ($> 20\text{mM}$) hay pH bajos. Huntington y col. (1980) sugirieron que el descenso del pH ruminal se debe a una acumulación de ácidos totales y no al lactato, sobretodo en la acidosis subclínica, y hacen cuestionar la explicación tradicional del mecanismo de desarrollo de la acidosis ruminal. La teoría dice que el lactato empieza a acumularse a $\text{pH} < 5,5$ (Nocek, 1997), y el experimento 3 registró pocas muestras con estos valores.

Sin embargo, las conclusiones obtenidas de los dos experimentos con terneras en esta tesis no parecen estar claras, ya que difieren de las derivadas de otro trabajo realizado en nuestro grupo (Moya y col., 2008), el cual consistió en una inducción a acidosis en terneras dónde se obtuvo un total de 177 muestras (con las mismas variables estudiadas, a excepción de los de protozoos). Analizando los datos obtenidos en este estudio se deriva un modelo para la predicción del PHM con un $R^2 = 0,65$, dónde el factor principal es igualmente la concentración de AGV pero con un R^2 mucho menor, 0,37, muy próximo al obtenido por Sauvant y col. (1999). Las siguientes variables en importancia están relacionadas negativamente con el PHM y son el LAC (R^2 parcial = 0,12) y el VAL (R^2 parcial = 0,09). El LAC es un ácido graso con un pKa menor (3,9) al de los AGV (4,7-4,9), por lo que su acumulación favorece un descenso importante del pH. El VAL es uno de los principales productos de fermentación de *M. elsdenii* en un medio con lactato y glucosa (Marounek y col., 1989). El resto de variables presentes en el modelo sólo intervinieron alrededor de un 5% en todo su conjunto (ACET, IVAL, ME y BUT). Por lo tanto, de este estudio se deriva que el lactato sí tiene un papel considerable en el PHM. Estas diferencias se podrían atribuir a la variabilidad entre experimentos, ya que en este trabajo se presentaron más casos con valores de lactato superiores a 20 mM y, además, éstos fueron superiores a los encontrados en los experimentos de esta tesis (Figura 1).

En vacas, el isobutirato es el segundo factor en importancia, y explica de media alrededor del 8% de la variabilidad del PHM, presentando entre ellos una correlación positiva. El isobutirato es un AGV ramificado que proviene de la desaminación de la valina, y está documentado que la desaminación se inhibe a pH bajos (Lana y col., 1998). Es lógico que el isobutirato esté más relacionado con el PHM de las vacas que

con el de las terneras, ya que éste proviene de la desaminación, y la digestibilidad de la proteína es más alta en dietas altas en forrajes (Calsamiglia y col., 2008).

El resto de variables incluidas en el modelo no influyen demasiado en el PHM, ya que sus R^2 son menores al 0,05. Sin embargo, es interesante comentar la presencia de los holotricos en los experimentos con vacas en los que fueron analizados. Este resultado es curioso, porque aunque se sabe que los protozoos pueden tener un papel estabilizador en el rumen (Yokohama y Johnson, 1988), normalmente se atribuye este efecto a los entodiniomorfos, los cuales se encuentran en mayor número.

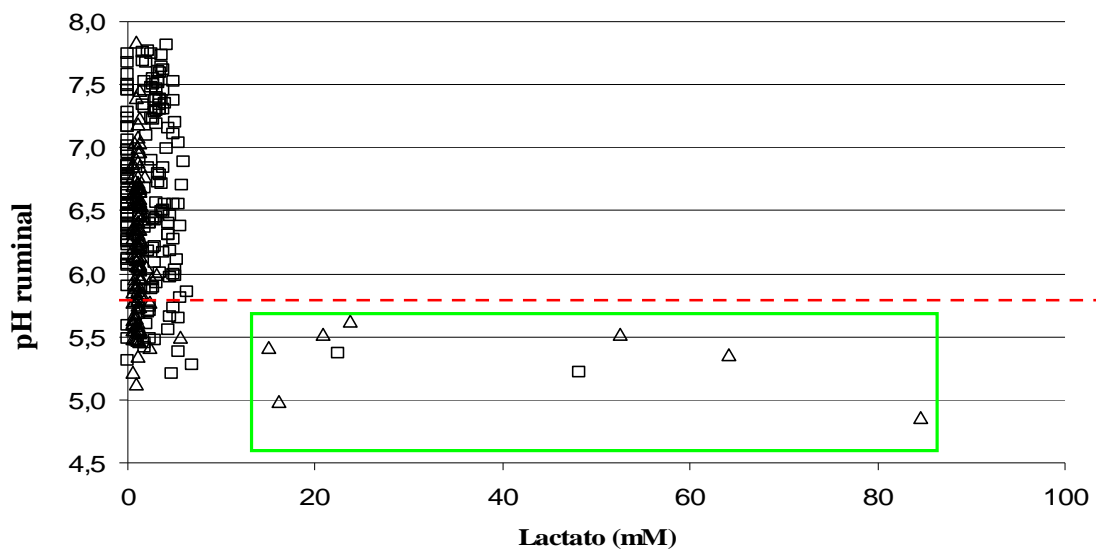


Figura 1. Relación entre pH y concentración de lactato en líquido ruminal de terneras en dos experimentos: Exp. 3 de la tesis (\square), experimento de Moya y col. (2008, Δ). La línea discontinua muestra $\text{pH} = 5,8$.

Los resultados derivados de este estudio de regresión con los datos procedentes de los cuatro experimentos que componen esta tesis doctoral, indican que la variable ruminal que más influye en el PHM es la concentración de ácidos grasos volátiles, mientras que el resto de variables juegan un papel muy minoritario. Sin embargo, algunas de las variables propuestas en este trabajo, como son la cuantificación de bacterias involucradas en la acidosis ruminal, el lactato y los protozoos, parecen estar relacionadas de algún modo. Por lo tanto, sería interesante realizar más estudios analizando estos parámetros para ampliar la base de datos y poder concluir resultados más robustos.

4. Parámetros ruminales que afectan a la concentración de ácido láctico

Tradicionalmente, la acumulación de lactato (**LAC**) se ha relacionado con la aparición de acidosis ruminal aguda (Nagaraja y Titgemeyer, 2007). Aunque siempre que hay concentraciones altas de lactato el pH es bajo, no siempre que hay pH bajos ($\text{pH} < 5,0$) se encuentran niveles altos de lactato (Owens y col., 1998; Figura 1). Además, los estudios que han observado concentraciones medias de lactato altas son escasos (Dougherty y col., 1975; Brown y col., 2006). Asimismo, en el apartado anterior se encontró únicamente un $R^2 = 0,02$ entre el PHM y LAC, aunque este modelo se basaba en el Exp. 3, en el cual se provocó fundamentalmente una acidosis subclínica. No obstante, en otro experimento realizado en nuestro grupo se observó un $R^2 = 0,12$ entre PHM y LAC (Moya y col., 2008).

Dada esta confusión acerca del papel que tiene el LAC y su variación, en este apartado se pretende detectar las variables ruminales que se correlacionan con la concentración de LAC. Para ello se utilizó, como en el apartado anterior, el procedimiento de regresión *Stepwise*. El LAC sólo fue estudiado en el Exp. 3, con una base de datos de 78 muestras, en los que se utilizaron las variables que se muestran en la Tabla 5.

El modelo de regresión resultante fue:

$$\text{LAC} = 41,1 + 0,033 \text{ SB} - 5,41 \text{ VAL} + 0,044 \text{ ME} - 0,35 \text{ PROP} + 0,13 \text{ ACET} - 5,13 \text{ pH}$$

Tabla 5. Variables utilizadas en el análisis de regresión del lactato.

Variable	Abreviación	Unidades
Nitrógeno amoniacal	NH3	mg/100 mL
Ácidos grasos volátiles	AGV	mM
Ácido acético	ACET	mol/100 mol
Ácido propiónico	PROP	mol/100 mol
Ácido butírico	BUT	mol/100 mol
Ácido valérico	VAL	mol/100 mol
Ácidos grasos volátiles ramificados	RAM	mM
<i>Streptococcus bovis</i>	SB	DNA bacteria/mL líquido ruminal
<i>Megasphaera elsdenii</i>	ME	DNA bacteria/mL líquido ruminal
Entodiniomorfos	ENT	\log_{10}
Holotricos	HOL	\log_{10}

Los R^2 parciales se muestran en la Tabla 6. El R^2 del modelo fue del 0,54, que significa que las variables seleccionadas explican sólo parcialmente la variabilidad del LAC. La cuantificación de *S. bovis* es la variable que más influye sobre el LAC. Este resultado es esperado, ya que *S. bovis* es una de las principales bacterias productoras de ácido láctico en dietas ricas en concentrado (Nocek, 1997), como es el caso de una dieta de terneras. Las siguientes variables relacionadas con el LAC son el VAL y *M. elsdenii*, con unos R^2 del 0,08 y 0,08, respectivamente. El VAL está correlacionado negativamente con el LAC, puesto que es uno de los principales productos de fermentación de la utilización del lactato y la glucosa por parte de *M. elsdenii* (Marounek y col., 1989). No obstante, es curioso que la correlación entre LAC y *M. elsdenii* sea positiva, ya que *M. elsdenii* es una bacteria utilizadora de lactato; quizás la presencia de lactato estimula su crecimiento. El resto de variables presentes en el modelo tienen un papel poco relevante, con R^2 inferiores al 0,05. Es interesante comentar la relación negativa entre LAC y PROP, debido a que el PROP es un producto de fermentación del lactato por parte de *M. elsdenii* (Counotte y col., 1981; Marounek y col., 1989). El R^2 entre el pH y el LAC sólo fue del 0,03, ya que, como hemos observado anteriormente, sólo alrededor del 10% de los casos en que el pH es inferior a 5,8 se encuentran concentraciones de lactato > 20 mM.

Tabla 6. Coeficientes de determinación (R^2) parciales del modelo de regresión del lactato.

Variable	R^2
SB	0,276
VAL	0,083
ME	0,077
PROP	0,042
ACET	0,034
pH	0,026
R^2 modelo	53,7

Por último, al igual que en el apartado anterior, existe divergencia entre las conclusiones derivadas del experimento de esta tesis con otro realizado en nuestro mismo grupo (Moya y col., 2008), en el cual el modelo resultante de la predicción de la concentración

de LAC tuvo un R^2 del 0,50, coeficiente similar a los resultantes en el Exp. 3, pero en el que los factores con más peso fueron el ACET ($R^2 = 0,18$), el pH ($R^2 = 0,12$) y el VAL ($R^2 = 0,10$), el primero relacionado positivamente y los otros dos negativamente con el lactato, como era de esperar. Las otras variables incluidas en el modelo no presentaron mucha relación con el LAC ($R^2 < 0,05$). No obstante, es interesante comentar que *M. elsdenii* presentó una relación positiva con el LAC, como se había observado en el Exp. 3. Las diferencias entre modelos se podrían atribuir a la variabilidad entre experimentos, ya que el porcentaje de muestras con pH subóptimo ($< 5,8$) fue más del doble en el estudio de Moya y col. (2008) que en el Exp. 3 de esta tesis (28,3% y 12,3%, respectivamente), a pesar de que se realizaron en las mismas instalaciones, con unas dietas muy similares y los mismos métodos de análisis. Estas diferencias observadas entre experimentos abre el debate sobre la dificultad de desarrollar un modelo animal repetible para inducir acidosis en situaciones experimentales.

Por lo tanto, al igual que en el estudio de regresión anterior, para obtener resultados más contundentes acerca de los factores que afectan a la variabilidad del lactato, son necesarios más estudios, pero los resultados de la cuantificación de *S. bovis* y *M. elsdenii* parecen importantes.

5. Nuevas estrategias de prevención de la acidosis ruminal.

Esta tesis ha evaluado dos nuevas estrategias de prevención de la acidosis ruminal: la inmunización pasiva contra *S. bovis* y la inhibición de la actividad amilasa a nivel ruminal. La comparación entre las dos alternativas es difícil de hacer, ya que se han probado en condiciones distintas y extremas, una en terneras de engorde con una inducción a la acidosis y, la otra, en vacas en lactación con niveles de carbohidratos no fibrosos por encima de las recomendaciones de la NRC (2001). Además, no es posible realizar balances económicos sobre la utilización de estos aditivos ya que la preparación de anticuerpos no se comercializa en Europa y, la acarbose todavía no está comercializada. Tampoco es posible hacer estudios comparativos de estas sustancias con otras alternativas existentes en el mercado, ya que estas estrategias son muy nuevas y existen muy pocos estudios al respecto. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis con ambas estrategias parecen prometedores con la finalidad de disminuir el riesgo de acidosis ruminal. Las dos alternativas tienen el objetivo común de disminuir la

fermentabilidad rápida de los carbohidratos no fibrosos en el rumen, disminuyendo la actividad amilasa, bien inhibiendo las bacterias que realizan esta función (inmunización pasiva contra *S. bovis*), o bien inhibiendo sólo esta actividad enzimática (acarbose). Si la inhibición de la actividad amilasa en el rumen es efectiva, ésta tiene que resultar en un aumento de la cantidad de almidón que llega al intestino delgado y, según observaron Nocek y Tamminga (1991), eso se traduciría en una disminución de su digestibilidad en porcentaje y, por lo tanto, se perdería eficiencia. Además, la adición de estos aditivos tiene un coste añadido a la dieta. Por lo tanto, tal vez sería interesante optar por disminuir ligeramente el contenido de carbohidratos no fibrosos en la dieta en vez de añadir aditivos que lo que hacen es disminuir la digestibilidad de estos por intentar prevenir trastornos digestivos, aún más actualmente, con el elevado coste de los cereales.

6. Reflexiones

En este apartado se ha querido comentar algunas de las percepciones y reflexiones que han surgido a lo largo del desarrollo de esta tesis.

6.1. Inducir acidosis ruminal en condiciones experimentales

En un apartado anterior de esta discusión, se han evidenciado las diferencias existentes entre dos experimentos en los que se quiso inducir acidosis ruminal a terneras de engorde (Exp. 3 de esta tesis y el experimento de Moya y col., 2008). Ambos experimentos fueron muy similares (animales cruzados, dietas muy parecidas, mismas instalaciones, mismos métodos de análisis, etc.). Sin embargo, el experimento de Moya y col. (2008) registró un mayor porcentaje de muestras con $\text{pH} < 5,8$ y con concentraciones de lactato $> 20 \text{ mM}$. La única diferencia existente entre los protocolos experimentales fue que Moya y col. (2008) realizaron una restricción de alimentación de 12 horas durante la noche para forzar la ingestión el día siguiente. De hecho, esta restricción surgió de observaciones resultantes del Exp. 3 de esta tesis, en las que se observó que los animales regulaban su ingestión cuando se acercaban a una situación de acidosis ruminal. Los animales que registraban $\text{pH} < 6,0$ a primera hora de la mañana dejaban de comer durante unas horas (probablemente hasta la recuperación de su pH ruminal) y luego volvían a ingerir alimento, pero estos cambios en el patrón de ingestión fue una observación y no se pudieron demostrar, ya que sólo se registró la

ingesta diaria. Por lo tanto, el registro continuo de la ingestión individual podría ser muy útil en futuros experimentos para explicar el comportamiento que tienen los animales frente a situaciones de riesgo de acidosis. Además, es interesante comentar que el diseño del protocolo del Exp. 3 se podría asemejar más a la situación de los animales dominantes en una explotación (los cuales comen cuando quieren) y, el diseño del protocolo de Moya y col. (2008), se asemejaría más a la situación de los animales sumisos (los cuales comen cuando les dejan).

6.2. Registro del pH ruminal

En los experimentos 1 y 3 se registró el pH ruminal con un pHmetro portátil a las 0, 4, 8 y 12 h post-alimentación (Exp. 1) y a las 0 y 6 h post-alimentación (Exp. 3). Sin embargo, en los experimentos 2 y 4 el pH ruminal se registró electrónicamente a intervalos de 22 minutos. Por lo tanto, los datos de los experimentos 2 y 4 permitieron comparar los pH medios diarios (**PHM**) obtenidos utilizando los datos cada 22 minutos (Continuo), los datos cada 4 h durante todo el día (4h-24) y los datos cada 4 h durante 12 h (4h-12), estos dos últimos simulando muestreos puntuales. Además, en los experimentos 2 y 4 también se tomaron los pH manualmente mediante un pHmetro portátil a las 0, 4, 8 y 12 h post-alimentación, aprovechando los muestreos de líquido ruminal para analizar otros parámetros. Los datos obtenidos manualmente y los datos derivados del registro electrónico cada 4h durante 12 h permitieron comparar ambas metodologías.

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 2 y 3. En primer lugar, si se comparan los PHM obtenidos con distintas frecuencias de muestreo utilizando los datos del registro electrónico, se observa que disminuyendo la frecuencia de muestreo los valores medios se van alejando y, al mismo tiempo, los errores estándares aumentan, lo que puede repercutir en el poder estadístico del ensayo. Y en segundo lugar, si se comparan los valores obtenidos cada 4 h durante 12 h utilizando el registro electrónico y manual, se observa que el método puntual presenta errores estándares más grandes y, además, los valores del pH son superiores. Estas diferencias entre el pH registrado automáticamente y el manual se pueden deber a distintos factores: temperatura del líquido ruminal (el método continuo se encuentra *in situ*, lo que permite una lectura del pH inmediata y con la temperatura corporal del animal), zona de muestreo del líquido ruminal, calibración de los aparatos, etc. Por lo tanto, para aumentar la precisión sería

conveniente aumentar la frecuencia de muestreo e, idealmente, hacer un registro continuo del pH, ya que un registro manual muy seguido es inviable. Sin embargo, el método continuo tiene algunos inconvenientes: mayor coste, mayor tamaño, pérdida de datos por entrada de líquido dentro del aparato, etc.

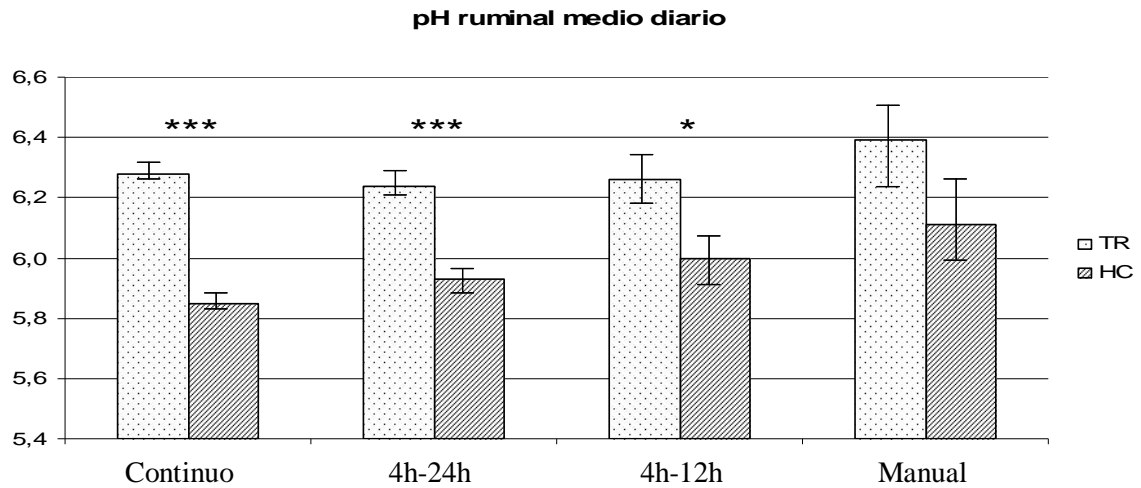


Figura 2. pH ruminal medio diario en el experimento 2 entre tratamientos (TR: traditional ration, HC: high NFC ration) utilizando los datos de pH cada 22 minutos (Continuo), cada 4 h durante todo el día registro electrónico (4h-24h), cada 4h durante 12 h registro electrónico (4h-12h), cada 4h durante 12 h registro puntual (Manual). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

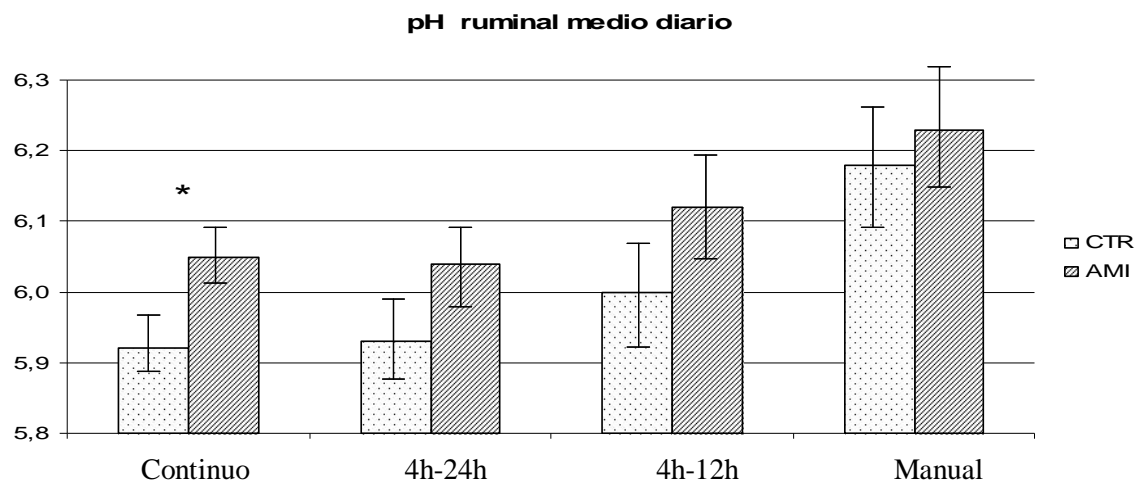


Figura 3. pH ruminal medio diario en el experimento 4 entre tratamientos (CTR: control, AMI: acarbose) utilizando los datos de pH cada 22 minutos (Continuo), cada 4 h durante todo el día registro electrónico (4h-24h), cada 4h durante 12 h registro electrónico (4h-12h), cada 4h durante 12 h registro puntual (Manual). * $P < 0,05$.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES GENERALES

The results obtained in this thesis allow to conclude that in our experimental conditions:

- Real time PCR is an effective tool to quantify *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii* in ruminal fluid of cows and heifers, and this method may help to better understand the changes in microbial populations associated to ruminal acidosis.
- In lactating dairy cows, diets containing 47.4% of non-fiber carbohydrates (NFC) compared with a 42.9% may increase milk yield and milk protein percentage; however, some negative effects such as milk fat depression, decrease of ruminal pH and increase of lameness risk, may occur.
- In lactating dairy cows fed a high-concentrate ration (47.4% NFC), the addition of an amylase inhibitor (acarbose, 0.75 g/animal/d) increases average ruminal pH and decreases the number of hours at suboptimal pH (pH < 5.6) without modifying general ruminal fermentation pattern and animal metabolism.
- In crossbred heifers, inducing acidosis by increasing 2.5 kg concentrate/d up to 12.5 kg concentrate/d is resulted in 67% of animals with acidosis.
- Acidotic animals recovered most of the initial rumen fermentation values four days after acidosis after shifting to a 50:50 forage:concentrate diet the day after acidosis diagnosis.
- In crossbred heifers, the addition of a multivalent polyclonal antibody preparation (RMT Optimize™, CAMAS Inc., MN, 10 mL/animal/d) may be effective in reducing the number of heifers that developed acidosis during transition from a high-forage diet to a high-grain diet. However, the fermentation and microbial profile of acidotic animals was not affected by the antibody preparation.
- Total concentration of volatile fatty acids is the ruminal variable most related with average ruminal pH, explaining between 52% and 74% of its variability.

CAPÍTULO 8

ANEXOS

Anexo 1.

Métodos de estudio de la microflora ruminal

MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA MICROFLORA RUMINAL

1. Introducción

La comunidad bacteriana residente en el rumen se caracteriza por su alta densidad, diversidad y complejidad de interacciones. Hasta hace pocos años, la identificación y clasificación de microorganismos (sobretudo bacterias) se basaba en características fenotípicas (morfología celular, presencia de estructuras, productos de fermentación,...). La dificultad de cultivar muchos microorganismos ruminales ha llevado a algunos autores a la conclusión errónea de que la diversidad microbiana ruminal es limitada, pero en la actualidad se considera que en hábitats naturales, el conteo cultivable es de 10 a 100 veces inferior al conteo total (Brock, 1987). Además, el cultivo de microorganismos ruminales tiene la dificultad añadida de que la mayoría son anaerobios estrictos y las necesidades de los medios de cultivo son con frecuencia desconocidas. No obstante, los métodos moleculares aplicables a microbiología desarrollados en los últimos años, sobretudo a partir de la década de los 80, han supuesto un avance muy importante en el conocimiento de la microflora ruminal.

Aunque se sigan utilizando algunos métodos tradicionales para el estudio de la microbiota ruminal, a continuación se explican con más detalle algunas de las técnicas más empleadas actualmente basadas en estudios moleculares.

2. Técnicas moleculares

Las nuevas técnicas moleculares desarrolladas en los últimos años han permitido un enorme avance en el conocimiento de la microflora ruminal. En especial, los métodos basados en el análisis de la secuencia de ácidos nucleicos (DNA o RNA) proporcionan la caracterización molecular que permite determinar las relaciones filogenéticas entre microorganismos (Woese, 1987). Al mismo tiempo, también permiten la identificación de nuevas especies que antes no habían podido ser cultivadas, hasta poder llegar a una descripción completa del ecosistema (Raskin y col., 1997; Mackie y col., 1999).

Al principio se diseñaron experiencias basadas en la hibridación de oligonucleótidos complementarios a secuencias concretas (Amann y Kuhl., 1998; Raskin y col., 1997;

Mackie y col., 1999). Sin embargo, donde se ha visto el gran poder de los métodos moleculares ha sido a partir del análisis de las secuencias 16S rRNA/DNA. La subunidad pequeña del ribosoma bacteriano (30S) contiene 21 proteínas y el fragmento 16S rDNA. Este último, contiene regiones altamente conservadas y algunas variables que permiten establecer las relaciones filogenéticas, así como también puede usarse como oligonucleótido para la amplificación mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por esta razón, es actualmente la molécula más utilizada, aunque no la única.

En ecología molecular es importante diferenciar entre identificación, cuantificación y monitorización de la actividad o función. El tipo de información obtenida depende mucho del tipo de diana de ácido nucleico utilizada y del diseño de la técnica experimental. Principalmente, se pueden dividir entre métodos basados en DNA y métodos basados en rRNA/rDNA (Mackie y col., 2000).

2.1. Estudios basados en DNA y rRNA/rDNA en el ecosistema ruminal

2.1.1. Estudios basados en DNA en el ecosistema ruminal

Los primeros estudios basados en el análisis de ácidos nucleicos fueron con DNA hace dos décadas (Attwood y col., 1988), y consistieron en clonar un fragmento de una cepa de *Bacteroides rumenicola* para ver la supervivencia de esta bacteria una vez introducida en el rumen. En general, estos métodos presentan alta especificidad y sensibilidad. Se han utilizado para estudiar algunas especies en el tracto gastrointestinal como *Butyrivibrio fibrisolvens* (Mannarelli y col., 1990), *Fibrobacter succinogenes* (Koike y Kobayashi, 2001) y *Selenomonas ruminantium* (Ning y col., 1991). Tienen el inconveniente de que requieren cultivos puros y que no son tan adecuados para la caracterización detallada de un ecosistema como lo son las técnicas con rRNA/rDNA.

2.1.2. Estudios basados en rRNA/rDNA en el ecosistema ruminal

Los principios y la puesta en práctica de métodos basados en 16S rRNA han sido extensamente revisados (Pace y col., 1986; Raskin y col., 1997; Mackie y col., 1999), pero su aplicación en microecología gastrointestinal se ha consolidado sobretodo en la

última década. Estos estudios consisten en hacer análisis comparativos de las secuencias de 16S rRNA en el que se puedan diferenciar microorganismos si hay regiones que difieren en la secuencia conservada. Estos métodos también son aplicables al fragmento 23S rRNA, pero su uso es aún limitado por la menor disponibilidad de secuencias. Sin embargo, sería una buena alternativa en un futuro ya que contiene más información que el fragmento 16S rRNA (3000 pares de bases comparado con 1500; Mackie y col., 2000).

Stahl y col. (1988) demostraron por primera vez su aplicación al estudio de la microflora gastrointestinal, y trabajaron con cepas de *F. succinogenes* y *Lachnospira multiparus* de rumen de vacuno. Posteriormente, han aparecido muchos estudios que hacen referencia a grupos específicos de bacterias mediante la utilización de oligonucleótidos grupo-específicos: metanogénicas (Lin y col., 1997; Whitford y col., 2001), fermentadoras obligadas de aminoácidos (Krause and Russell, 1996; Attwood y col., 1998), celulolíticas o proteolíticas (Reilly y col., 2002), etc. Por el contrario, existe un número limitado de estudios con métodos basados en el uso de rRNA sobre protozoos y hongos ruminales. La mayoría de trabajos estudian la simbiosis entre protozoos y bacterias metanogénicas (Finlay y col., 1994; Sharp y col., 1998; Sylvester y col., 2004; Sylvester, 2005), pero no los detectan individualmente. Al mismo tiempo, se han hecho estudios filogenéticos usando la secuencia 18S rRNA; por ejemplo, se han estudiado los protozoos *Entodinium*, *Epidinium* y *Polyplastron* (Wright y col., 1997), así como *Neocallimastix spp.* y otros hongos ruminales (Doré y Stahl, 1991; Thill y col., 1997).

Sin embargo, desde el punto de vista funcional no nos interesa tanto clasificar los diferentes métodos según los ácidos nucleicos diana, sino más bien en cuantitativos y cualitativos según sea nuestro objetivo de estudio (Tabla 1).

Tabla 1. Métodos moleculares más usados para el estudio de la microflora gastrointestinal.

CUALITATIVOS	CUANTITATIVOS
PCR convencional	Hibridación <i>in situ</i> (FISH)
Clonación y secuenciación	Dot-blot Hybridization
DGGE/TGGE	PCR a tiempo real
T-RFLP	

2.2. Métodos moleculares más usados para el estudio de la flora gastrointestinal

Los métodos moleculares los podemos clasificar en cualitativos y cuantitativos dependiendo del objetivo de estudio.

2.2.1. Métodos cualitativos

Las técnicas moleculares cualitativas en el estudio de la microflora ruminal se usan cuando el objetivo es estudiar el perfil de un ecosistema, o bien cuando lo que interesa es la presencia o no presencia de un determinado microorganismo o molécula. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR convencional) es la base de todas estas técnicas. Entre los métodos más usados están: clonación-secuenciación, electroforesis en gradiente desnaturizante (DGGE) y T-RFLP.

2.2.1.1. PCR convencional/a tiempo final

La reacción en cadena de la polimerasa fue inventada por Kary B. Mullis en 1985, el cual fue condecorado con el Premio Nobel de Química en 1993. Al principio, esta técnica era completamente manual y muy laboriosa, pero cada vez se ha ido automatizando más el proceso. Además, la PCR convencional o a tiempo final es la base de muchas otras técnicas moleculares, como por ejemplo, la clonación-secuenciación y la DGGE.

Esta técnica consiste en la amplificación secuencial *in vitro* de un fragmento de ácidos nucleicos específico, por lo que es necesario conocer, al menos parcialmente, la

secuencia de éste. Para llevar a cabo la reacción, debemos disponer de: el ADN en estudio, los primers (oligonucleótidos complementarios a cada uno de los extremos 3' de la región a amplificar), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP: dATP, dGTP, dTTP y dCTP, en una mezcla equimolar de cada uno de ellos), enzima polimerasa y otros (agua miliQ, tampón, cloruro de magnesio). Una vez se dispone de todos los componentes en el tubo de reacción, tenemos que favorecer la síntesis de DNA, la cual consta de 3 pasos controlados por la temperatura (Figura 1.a.):

1. Desnaturalización del DNA.
2. Alineamiento de los primers (apareamiento con su región complementaria).
3. Extensión (síntesis de DNA por parte de la polimerasa).

Estos tres pasos constituyen un ciclo, y es necesaria una repetición secuencial de ciclos (30-40) para hacer una amplificación exponencial, obteniendo así 2^n copias del fragmento de interés (Figura 1.b.). Finalmente, para detectar el producto amplificado, se realiza una electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida, dónde se añade bromuro de etidio que se intercala en la doble cadena de DNA y se visualiza mediante un transiluminador de radiación ultravioleta.

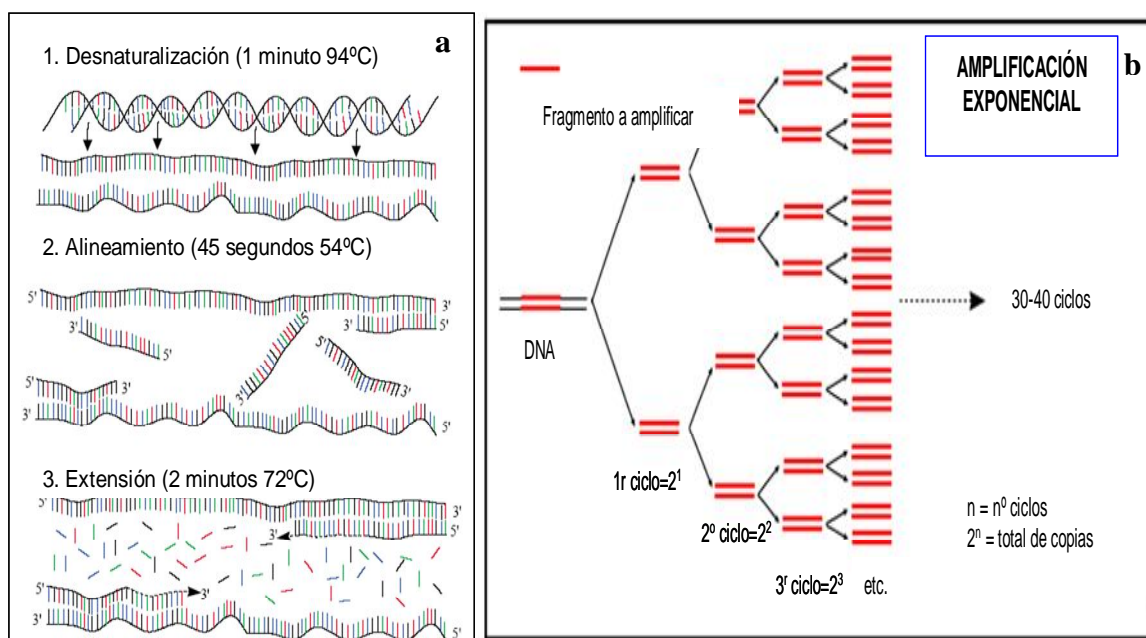


Figura 1. a. Fases de la reacción en cadena de la polimerasa. **b.** Amplificación exponencial de la reacción en cadena de la polimerasa (Andy Vierstraete, 1999).

2.2.1.2. Clonación y secuenciación

La clonación consiste en insertar copias del fragmento 16S RNA previamente amplificados por PCR (a partir del DNA de las muestras) en un vector, generalmente un plásmido, de tal manera que este material se mantendrá y se replicará dentro de la célula bacteriana. A partir del cultivo de las bacterias clonadas se extrae y se secuencia el DNA. Es una técnica que permite obtener información de la secuencia nucleotídica de bacterias no cultivables, como pueden ser muchas de las que se encuentran en el medio ruminal. Aunque es un método válido, actualmente no se usa mucho porque es muy laborioso y no permite su utilización rutinaria en estudios de microbiología gastrointestinal.

2.2.1.3. DGGE (Electroforesis en gradiente desnaturizante)

La electroforesis en gradiente desnaturizante se basa en la migración de moléculas de DNA a través de geles de poliacrilamida que contienen concentraciones crecientes de agente desnaturizante, como formiamida y urea; en ocasiones también se han utilizado gradientes de temperatura de forma satisfactoria, en cuyo caso la técnica pasa a nombrarse TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis).

La separación de fragmentos de DNA por DGGE se basa en las propiedades de fusión del DNA de doble cadena. Una molécula de DNA se desnaturizará en regiones discretas llamadas dominios de fusión, y cada uno desnaturizará a una temperatura concreta, llamada temperatura de fusión o T_m (temperatura a la que cada par de bases de DNA dúplex está en equilibrio 50 a 50 entre estado helicoidal y el desnaturizado). La T_m de un DNA concreto es enormemente dependiente de la secuencia de nucleótidos que se desplaza a través de un gel en gradiente desnaturizante; en el punto donde la concentración del agente desnaturizante iguala a la T_m de su dominio de menor temperatura de fusión, causará una desnaturización parcial y un retraso en la movilidad electroforética que podrá distinguirse visualmente. El método permite la separación de fragmentos de DNA que difieren en un solo nucleótido. Cuando se combina con PCR, la DGGE es uno de los métodos de elección para la detección de mutaciones puntuales de DNA.

Esta técnica permite obtener un perfil global de la diversidad microbiana de un medio, motivo por el cual ha sido muy utilizada en ecología microbiana. Los primeros trabajos que usaron la electroforesis desnaturalizante para estudiar la microflora ruminal se realizaron a finales de la década de los noventa (Kocherginskaya y col., 1997). Posteriormente, también se ha usado para estudiar grupos concretos de la población del rumen como, por ejemplo, el género bacteriano *Oscillospira* (Mackie y col., 2003, Figura 2) o los ciliados (Regensbogenova y col., 2004).

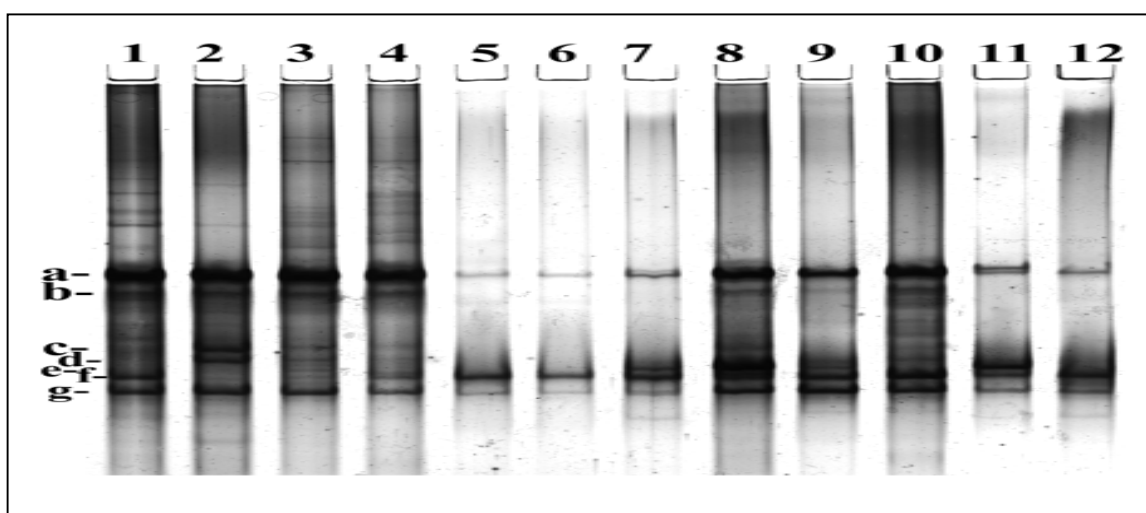


Figura 2. DGGE con amplificación previa con PCR de un fragmento del 16S rRNA de *Oscillospira*. La figura muestra la separación por DGGE del patrón de fragmentos de la PCR obtenidos de renos noruegos (columnas 1 a 4), de vacas (columnas 5 y 6), y de ovejas (columnas 7 a 12). Las letras (a-g) indican las bandas representativas de DNA, las cuales pueden extraerse para posterior clonación y secuenciación. Según Mackie y col. (2003).

2.2.1.4. T-RFLP

La técnica del T-RFLP (*Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism*, Figura 3) consiste en usar una PCR universal de bacterias para amplificar una secuencia de la región 16S rRNA del DNA total, pero con alguna particularidad. Uno de los dos primers se marca fluorescentemente en el extremo 5'. El producto de la PCR se digiere mediante enzimas de restricción, y los fragmentos terminales marcados se pueden analizar en geles de poliacrilamida de alta resolución mediante un secuenciador automatizado de DNA. Se obtiene un patrón de bandas de cada muestra, que dependerá de la diversidad microbiana en aquella muestra, ya que cada secuencia nucleotídica propia de una bacteria resulta en un fragmento terminal diferente.

Esta técnica no permite secuenciar directamente las bandas, ya que éstas son fragmentos de restricción. Sin embargo, es posible hacer una inferencia a través de las bases de datos disponibles en la red, según los oligonucleótidos diseñados para la PCR y los enzimas de restricción utilizados permiten hacer una predicción de cada especie bacteriana según el tamaño de fragmentos que se obtendrían. Los programas disponibles en la red (T-RFLP Analysis Program en: www.rdp.com) están diseñados para facilitar el análisis comparativo de la comunidad bacteriana que estamos analizando y para proporcionar el punto filogenético de la referencia.

La T-RFLP es una herramienta potente para estudiar la diversidad de comunidades bacterianas complejas y para una rápida comparación entre la estructura y diversidad de distintos ecosistemas. En realidad, se puede considerar como una técnica semi-cuantitativa, ya que permite estimar, de forma relativa, la cantidad de un determinado microorganismo, según la altura de su pico en el electroferograma (Figura 3. nº5).

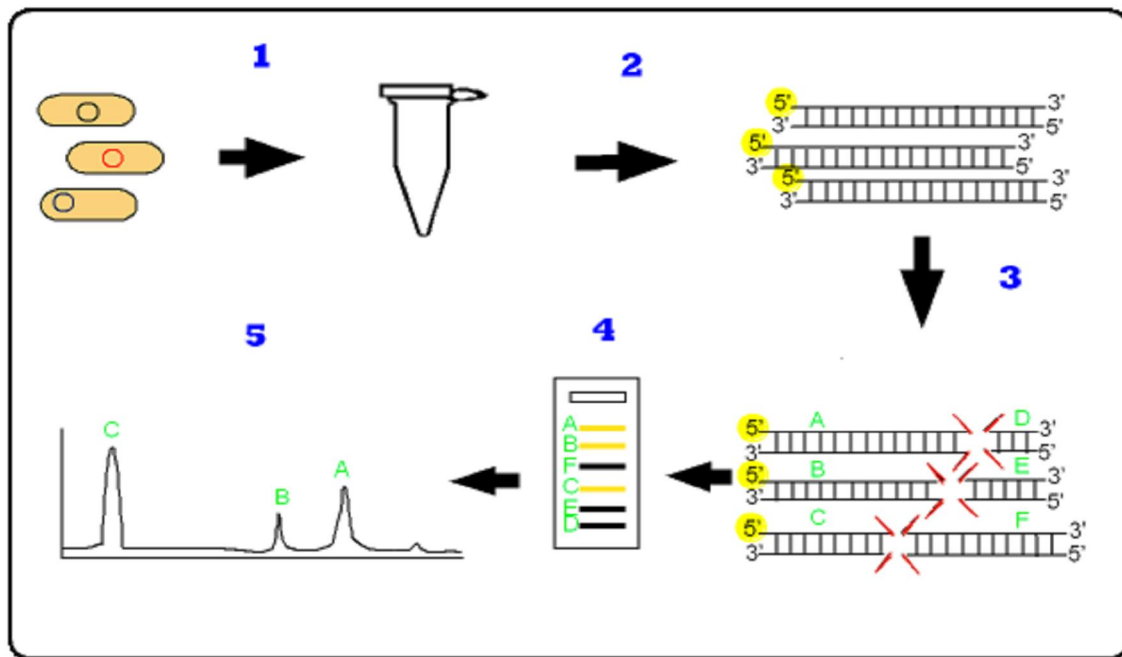


Figura 3. Esquema de la técnica de T-RFLP: 1) Extracción de DNA de la muestra, 2) PCR con oligonucleótidos marcados en el extremo 5', 3) Digestión con enzimas de restricción del producto amplificado mediante PCR, 4) Separación de los fragmentos en un gel secuenciador, 5) Electroferograma: Reconocimiento de los fragmentos marcados.

Originalmente fue desarrollada con el fin de diferenciar entre distintas especies de micobacterias (Avaniss-Aghajani y col., 1996), y su primera aplicación para estudiar la diversidad de 16S rRNA en muestras ambientales fue en 1997 (Liu y col., 1997). Asimismo, también se ha utilizado en distintas ocasiones para el estudio del ecosistema ruminal (Attwood y col., 1998; Tokura y col., 1999).

2.2.2. Métodos cuantitativos

Actualmente, existen métodos moleculares que permiten al mismo tiempo tanto el estudio cualitativo como cuantitativo de los ecosistemas. Entre las técnicas más usadas están: la hibridación fluorescente *in situ*, la PCR a tiempo real, y, en menor medida, la hibridación *Dot-blot*.

2.2.2.1. FISH (Fluorescent *in situ* hybridation)

La hibridación fluorescente *in situ* utiliza moléculas fluorescentes (p.ej. biotina o fluoresceína) para localizar fragmentos concretos de DNA. La técnica consiste en preparar secuencias cortas de DNA de una sola hebra (sondas) que corresponden a las secuencias complementarias de DNA que se quieren marcar y examinar. Las sondas se marcan con las moléculas fluorescentes y se unen al DNA complementario, lo cual permite localizar las secuencias en las que se encuentran mediante contaje directo con microscopio de fluorescencia. Dependiendo de si el objetivo de estudio es contaje total o específico, las sondas que se utilicen pueden ser más o menos selectivas. En el primer caso serán complementarias a regiones universales bacterianas y, en el segundo caso, serán regiones específicas del grupo en cuestión. Es una técnica bastante común para el estudio de ecosistemas, como es el caso del rumen (Brookman y col., 2000; Yanagita y col., 2000; Mackie y col., 2003, Figura 4).

2.2.2.2. Dot-blot HYBRIDIZATION

La técnica de hibridación *dot-blot* utiliza sondas marcadas que se hibridan con ácidos nucleicos, y permite hacer una cuantificación relativa de una bacteria concreta respecto al total de bacterias. Para ello, es necesario el uso de dos sondas nucleotídicas (dentro del fragmento 16S rRNA): una sonda específica del grupo a estudiar y otra sonda de

bacterias universal. Consiste en extraer el RNA bacteriano muestra, a continuación fijarlo a una membrana y, por último, hibridar las sondas. Se ha usado para cuantificar microorganismos ruminales (Michalet-Doreau y col., 2002; Galbraith y col., 2004), aunque no con mucha frecuencia.

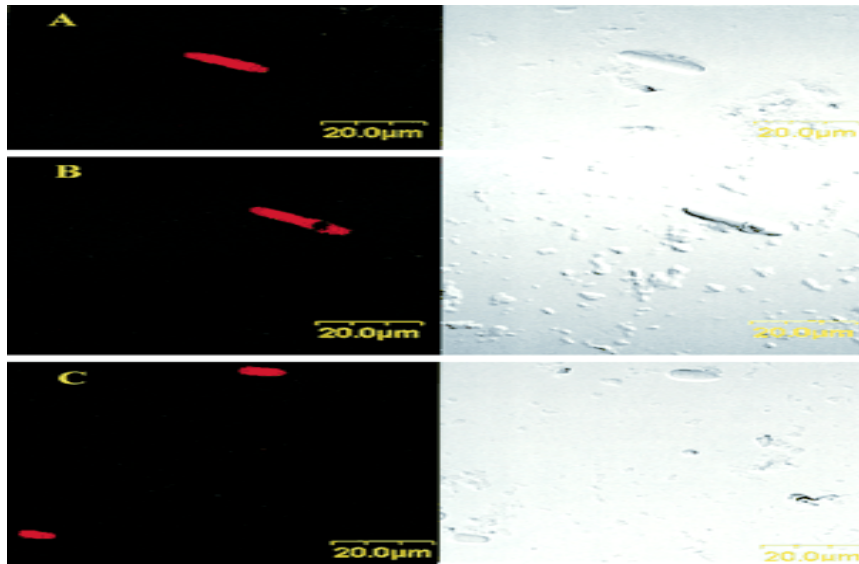


Figura 4. Hibridación fluorescente específica para *Oscillospira* en líquido ruminal de ganado vacuno en Illinois. Figura A muestra la morfología característica de *Oscillospira*, figura B con una espora en su interior, figura C muestra una morfología septada (atípica). Según Mackie y col. (2003).

2.2.2.3. La PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real (qPCR) es un sistema basado en la detección y cuantificación *on line* del producto amplificado, en el que los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea. La detección se consigue mediante la adición de fluorocromos (Tabla 2). La fluorescencia que emiten se registra en cada ciclo de reacción, y su señal incrementa proporcionalmente a la cantidad de producto de PCR. La técnica permite monitorizar toda la reacción y correlacionar durante la fase exponencial la emisión de fluorescencia con un número de copias inicial de la muestra. Para ello será necesario construir una curva patrón utilizando estándares con número

conocido de copias del DNA que queremos cuantificar. Con la PCR convencional sólo se puede hacer una detección a punto final, cuando la reacción ya está saturada.

Tabla 2. Fluorocromos más usados en PCR a tiempo real (λ : longitud de onda).

Fluorocromo	λ Excitación (nm)	λ Emisión (nm)
DABCYL	453	-
6-FAM	492	515
SYBR® Green I	497	520
TET	521	536
JOE	527	548
HEX	535	556
TAMRA	555	580
ROX	575	602
VIC®	538	554

Existen dos tipos de sistemas de detección por fluorescencia:

- 1) agentes intercalantes
- 2) sondas específicas marcadas con fluorocromos

1) Los agentes intercalantes son unos fluorocromos que, como su nombre indica, se intercalan en la doble hélice de DNA de nueva síntesis y al unirse aumentan notablemente su emisión de fluorescencia, la cual es captada por el lector. El más utilizado es el SYBR Green I (Figura 5).

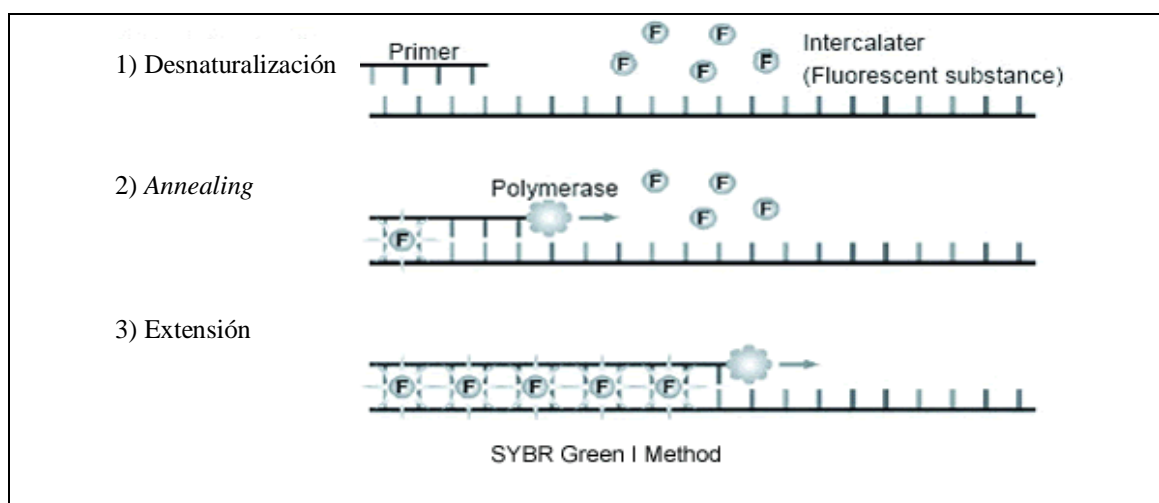


Figura 5. Agente intercalante SYBR Green I.

2) Las sondas de hibridación específicas están marcadas con dos tipos de fluorocromos: un donador y un aceptor. Este sistema se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia entre ambas moléculas. El donador (extremo 5') emite fluorescencia al ser excitado, y el aceptor (extremo 3') absorbe y anula la fluorescencia emitida por el donador, pero para que esto ocurra tienen que estar próximas en el espacio. Existen varios subtipos, siendo las sondas Taqman los más utilizados (Figura 6).

Las sondas Taqman son oligonucleótidos complementarios a un segmento de la región que queremos amplificar, dónde en el extremo 5' tiene el donador y en el extremo 3' tiene el aceptor. Cuando donador y aceptor están cercanos no emiten fluorescencia. Durante la amplificación de DNA la sonda se hibrida con su cadena complementaria, la DNA polimerasa empieza a desplazarse a lo largo de la cadena en su acción de síntesis, y en el momento que llega a la sonda hidroliza el extremo 5' liberando así el fluorocromo donador. A partir de este momento, como donador y aceptor están espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector.

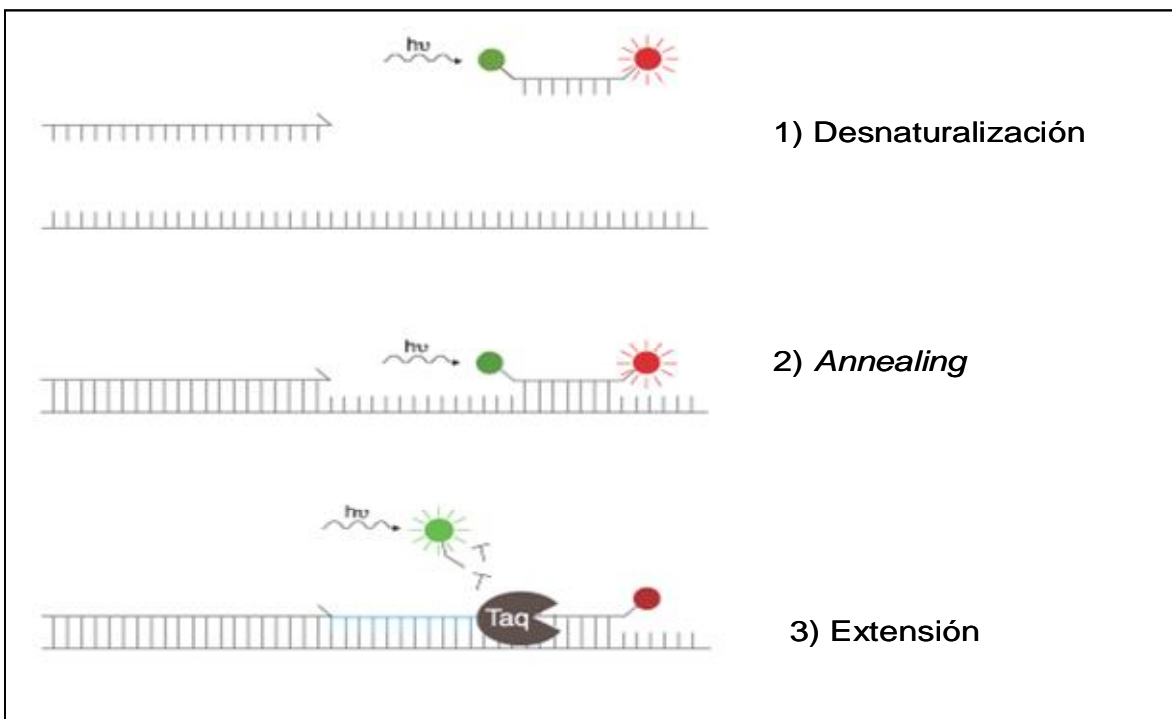


Figura 6. Sondas Taqman.

Interpretación de los resultados en equipos de qPCR para la cuantificación del DNA o RNA diana en la muestra:

Mediante esta técnica es posible cuantificar la concentración inicial de DNA (o RNA) diana de la muestra. Para ello es necesario construir una curva/recta patrón añadiendo unos controles externos con concentraciones conocidas y decrecientes (diluciones 1/10) de nuestro DNA diana en la tanda de amplificación. La pendiente de la curva patrón muestra la eficiencia de la PCR, siendo la pendiente de -3,32 cuando la eficiencia de la PCR es del 100%, aunque se puede admitir una pendiente de hasta -4,00 (Ginzinger, 2002). Asimismo, es necesaria una correlación mínima de 0,97.

En la qPCR el programa informático va registrando el incremento de fluorescencia (proporcional al aumento de DNA o RNA) en cada ciclo, y esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles en el *Amplification plot* (Figura 7), el gráfico de fluorescencia versus el ciclo de PCR. Para cada muestra, el programa informático calcula el número de ciclo a partir del cual el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo con respecto a la señal base o ruido de fondo (*Baseline*). El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina ciclo umbral (Ct, de *threshold cycle*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de DNA diana presente en la muestra. Con las concentraciones previamente conocidas de los controles externos y sus Ct correspondientes se dibuja una curva patrón. La concentración de DNA inicial de cada muestra problema se puede inferir interpolando en la curva patrón el valor de Ct.

Aplicación de la qPCR en microbiología gastrointestinal:

En los últimos años, los avances en biología molecular han permitido conocer mejor la diversidad real de la microflora gastrointestinal, siendo ésta mucho más compleja de lo que se había pensado durante muchos años. Esta falta de conocimiento se atribuye principalmente a la incapacidad de muchos microorganismos de crecer en medios de cultivo. Asimismo, estas técnicas, y en especial las cuantitativas, proporcionan unas ventajas respecto a los métodos tradicionales, entre las que destacan:

- la caracterización de un mayor número de especies
- la cuantificación de los microorganismos
- la posibilidad de establecer relaciones filogenéticas y estudios evolutivos
- la reducción del tiempo para procesar las muestras y obtener un resultado
- la conservación de las muestras congeladas hasta su análisis

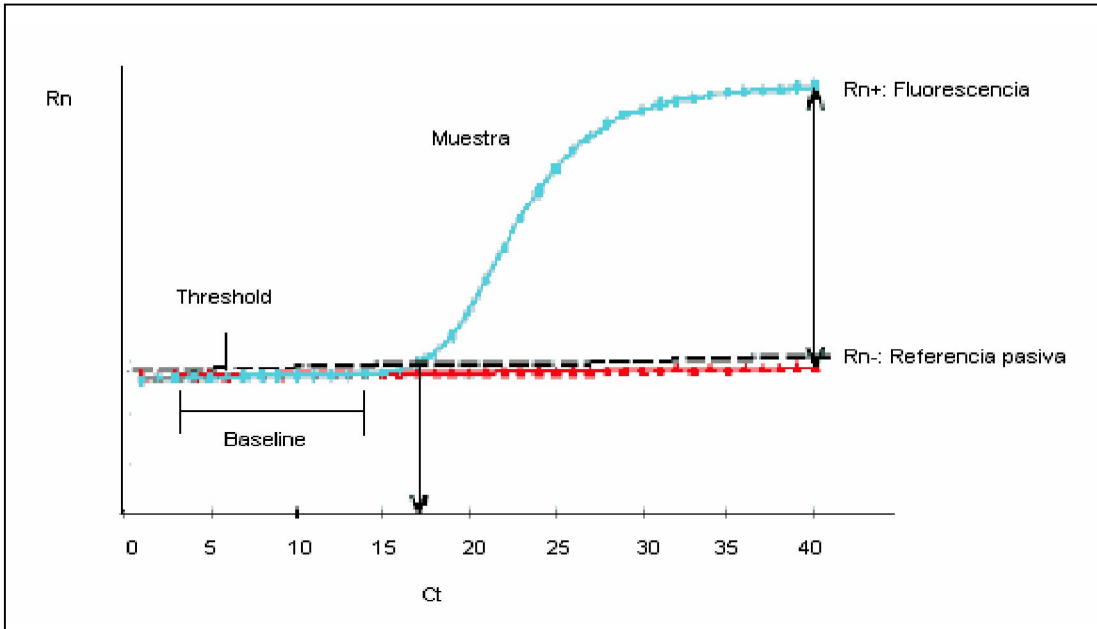


Figura 7. Amplification Plot.

En el caso de la qPCR encontramos ventajas añadidas:

- la gran rapidez de obtención de resultados (no es necesario un procesamiento posterior a la PCR), entre 40 minutos y 2 h dependiendo del equipo utilizado
- el análisis de un gran número de muestras a la vez, entre 32 y 384 dependiendo del equipo utilizado
- la posibilidad de analizar en una misma placa distintos microorganismos/fragmentos de ácidos nucleicos en estudio
- la disminución del riesgo de contaminación al tratarse de un sistema cerrado
- la posibilidad de cuantificar la concentración inicial de ácidos nucleicos presentes en la muestra de forma más sencilla, más precisa y con un rango mayor (5-6 log) que los métodos convencionales (2-4 log)

Aunque los equipos para qPCR tienen un costo inicial elevado, se pueden rentabilizar gracias a su rapidez y a su gran capacidad de procesamiento de muestras. Además, en un mismo instrumento se pueden llevar a cabo distintos tipos de ensayos: cualitativos, cuantitativos, determinación de mutaciones, PCR múltiples..., mientras que para los procedimientos tradicionales es necesario la utilización de varios equipos.

A consecuencia de su gran número de ventajas, la qPCR se está aplicando en numerosos estudios de la microflora gastrointestinal, siendo de especial importancia en este campo, donde gran parte de microorganismos son totalmente o en parte anaerobios, factor que dificulta mucho su cultivo. Ya se han realizado estudios que cuantifican los grupos bacterianos mayoritarios de la microflora gastrointestinal de humano (Requena y col., 2002, Gueimonde y col., 2004, Haarman y Knol, 2005), de grupos bacterianos específicos en cerdos (Konstantinov y col., 2005, Castillo y col., 2005) y de la microbiota ruminal (Tabla 3).

Tabla 3. Estudios de microflora ruminal mediante la técnica de PCR a tiempo real.

Microorganismo ruminal	Referencia
Hongos	Denman y McSweeney, 2006
Protozoos	Skillman y col., 2006; Sylvester y col., 2004
Archaea/Metanobacterias	Yu y col., 2005; Sundset y col., 2008
Eubacterias	Denman y McSweeney, 2006; Yu y col., 2005
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	Tajima y col., 2001
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Klieve y col., 2003; Paillard y col., 2007; Stevenson y Weimer, 2007
<i>Eubacterium ruminantium</i>	Tajima y col., 2001; Stevenson y Weimer, 2007
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Tajima y col., 2001; Denman y McSweeney, 2006; Stevenson y Weimer, 2007
<i>Megasphaera elsdenii</i>	Ouwerkerk y col., 2002; Stevenson y Weimer, 2007
<i>Prevotella spp.</i>	Stevenson y Weimer, 2007
<i>Prevotella albensis</i>	Tajima y col., 2001
<i>Prevotella brevis</i>	Stevenson y Weimer, 2007
<i>Prevotella bryantii</i>	Tajima y col., 2001; Stevenson y Weimer, 2007
<i>Prevotella ruminicola</i>	Tajima y col., 2001; Stevenson y Weimer, 2007
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	Tajima y col., 2001; Duval y col., 2007; Stevenson y Weimer, 2007
<i>Ruminococcus spp.</i>	Weimer y col., 2008
<i>Ruminococcus albus</i>	Stevenson y Weimer, 2007
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Shinkai y Kobayashi, 2007; Stevenson y Weimer, 2007
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Tajima y col., 2001; Stevenson y Weimer, 2007
<i>Streptococcus bovis</i>	Tajima y col., 2001; Klieve y col., 2003; Stevenson y Weimer, 2007
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	Tajima y col., 2001; Stevenson y Weimer, 2007
<i>Treponema bryantii</i>	Tajima y col., 2001

Anexo 2.

Procedimientos Normalizados de Trabajo

Extracción del DNA de bacterias ruminales CAA/TA/0026-00

1. INTRODUCCIÓN

Este documento describe el procedimiento normalizado de trabajo (PNT) para la extracción de DNA en muestras de líquido ruminal (LR).

2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

La metodología descrita es la que se realiza con muestras de líquido ruminal en el Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).

3. DEFINICIONES

SDS: Sodio dodecil sulfato.

LR: Líquido ruminal.

TE: TRIS-EDTA buffer.

4. CUALIFICACIÓN DEL PERSONAL

El personal del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos que tenga como mínimo el nivel de cualificación D según la clasificación descrita en el capítulo 6 del Manual de Calidad del Departamento, que haya sido debidamente entrenado y figure como personal autorizado en la libreta de los equipos correspondientes.

5. RESPONSABILIDADES

- a. Los usuarios que realicen esta técnica son responsables de leer este PNT y firmar en el registro de lectura de éste, trabajar correctamente y con precaución.
- b. El responsable de esta técnica ha sido asignado por el jefe del servicio o proyecto y se le reconoce el conocimiento del método y la responsabilidad de elaborar este PNT. Además debe procurar que el personal que la realice esté capacitado y conozca el PNT.
- c. El responsable del proyecto o servicio es el responsable de la aprobación de este PNT y de su difusión entre los miembros del grupo que vayan a

seguirlo. Además es el responsable de asignar un responsable de la técnica y de colaborar con él en mantener el PNT actualizado.

- d. La *Unitat de Garantia de Qualitat* es responsable de verificar el cumplimiento de este PNT.

6. NIVEL DE RIESGO

Existe **riesgo biológico** debido a la manipulación del líquido ruminal, que contiene elevada carga microbiológica, por lo que es preciso utilizar guantes para proteger posibles heridas que puedan entrar en contacto con el líquido.

Existe **riesgo químico** asociado al uso de fenol. Este producto es tóxico por inhalación, ingestión o por contacto con la piel, por lo que el usuario debe utilizar guantes, gafas o pantalla protectora y realizar las manipulaciones en la campana de extracción de gases. El polvo del SDS es nocivo por lo que su pesada debe realizarse con mascarilla o en campana de extracción.

7. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

a. Material y equipos

- Minibeadbeater
- Glass beads 0,1mm de diámetro
- Eppendorfs de 1,5 ml y de 2 ml
- Ultracentrífuga refrigerada para eppendorfs
- Micropipetas (20-200 µl y 200-1000 µl)
- Puntas de pipeta esterilizadas
- Estufa (37 °C)
- Cabina de flujo laminar
- Trozos de *cheesecloth*

I. REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

- SDS 10% (Sodio Dodecil Sulfate, Sigma L4522 o similar)
- TRIS-EDTA Buffer 100x (Sigma T9285 o similar)
- Fenol pH 8 (USB 75829 o similar)

- Etanol 70% (v/v)
- Etanol absoluto
- NaCl 2N
- RNAsa A (Roche 0109169000 o similar)
- Agua destilada milliQ

1. Preparación de TE 0,5 X:

- TRIS-EDTA Buffer 100x 1 ml
- Agua milliQ enrasar a 200 ml

2. Preparación de TE 1 X:

- TRIS-EDTA Buffer 100x 1 ml
- Agua milliQ enrasar a 100 ml

3. Preparación de RNAsa A (10mg/ml):

- RNAsa A 10 mg
- Agua milliQ 1 ml

Preparar eppendorfs de RNAsa A de 20 – 50 µl aproximadamente, y guardar a -20 °C.

b. Procedimiento

Durante todo el procedimiento es preciso trabajar con guantes de látex.

I. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE LR

- a) Filtrar líquido ruminal a través de 2 capas de *cheesecloth*.
- b) Colocar 1 ml de LR filtrado en 3 eppendorfs identificados y etiquetados.
- c) Conservar en congelación (-20 °C).

II. EXTRACCIÓN DE DNA

- a) Descongelar las muestras a temperatura ambiente.
- b) Si el técnico lo estima oportuno, clarificar el LR, para ello:

- i. Centrifugar a 600 g durante 10 min y a 4 °C
- ii. Recuperar sobrenadante en eppendorf
- c) Poner en otro eppendorf de 2 ml:
 - i. 0,6 ml LR (clarificado o no)
 - ii. 0,6 ml fenol pH 8
 - iii. 0,5 g de *glass beads*
 - iv. 40 µl SDS 10%
 - v. Agitar las muestras en el minibeadbeater a máxima velocidad durante 2 minutos
 - vi. Dejar enfriar en hielo picado durante 2 minutos
 - vii. Repetir el ciclo 2 veces más
- d) Centrifugar las muestras a 11600 g durante 5 minutos y a temperatura ambiente.
- e) Recuperar con sumo cuidado la fase acuosa y transferirla a un nuevo eppendorf (aprox. 0,6 ml).

Nota: La cantidad que se recupera es la que se utilizará para calcular el volumen de los reactivos que se tienen que utilizar.

- f) Añadir un volumen de fenol (la misma proporción que se recuperó en el paso “e”).
- g) Agitar 1min (manualmente).
- h) Centrifugar a 11600 g durante 10 min y a temperatura ambiente.
- i) Recuperar el sobrenadante (aprox. 0,5 ml).
- j) Proceder a la precipitación del DNA con etanol absoluto:
 - i. Añadir una décima parte (1/10 vol) respecto al sobrenadante de NaCl 2N (aprox. 50 µl)
 - ii. Añadir 2 partes (2 vol) respecto al sobrenadante de etanol absoluto (aprox. 1 ml)
 - iii. Agitar por inversión
 - iv. Someter a -20 °C durante un mínimo de 2 h
 - v. Centrifugar a 15000 g durante 30 min y a 4 °C
 - vi. Desechar el sobrenadante
- k) Lavar el pellet con etanol 70% de la siguiente forma:
 - i. Añadir 500 µl etanol 70%

- ii. Centrifugar a 15000 g durante 10 min y a 4 °C
 - iii. Eliminar sobrenadante
 - iv. Secar el precipitado colocando el eppendorf invertido con el tapón abierto sobre un papel secante y a temperatura ambiente
- l) Resuspender el precipitado:
- i. Añadir 100 µl TE 0,5 X + 2 µl RNAsa (10mg/ml)
 - ii. Incubar 1 hora a 37 °C
 - iii. Agitar el eppendorf golpeando con el dedo
- m) Después de la incubación proceder a una Re-extracción con fenol:
- i. Añadir 300 µl TE 0,5 X
 - ii. Añadir 400 µl fenol
 - iii. Agitar 1 min (manualmente)
 - iv. Centrifugar a 11600 g durante 10 min y a 20 °C
- n) Recuperar sobrenadante (aprox. 0,4 ml).
- o) Precipitar de nuevo con etanol absoluto de la siguiente forma:
- a. Añadir una decima parte (1/10 vol) respecto al sobrenadante de NaCl 2N (aprox. 40 µl)
 - b. Añadir 2 partes (2 vol) respecto al sobrenadante de etanol absoluto (aprox. 0,8 ml)
 - c. Agitar por inversión
 - d. Someter a -20 °C durante un mínimo de 2h
 - e. Centrifugar a 15000 g durante 30 min y a 4 °C
 - f. Desechar el sobrenadante
- p) Lavar el pellet con etanol 70% de la siguiente forma:
- a. Añadir 500 µl etanol 70%
 - b. Centrifugar a 15000 g durante 10 min y a 4 °C
 - c. Eliminar sobrenadante
 - d. Secar el precipitado colocando el eppendorf invertido con el tapón abierto sobre un papel secante y a temperatura ambiente
- q) Repetir el lavado del precipitado con etanol al 70 %.
- r) Resuspender el precipitado en 50 µl H₂O milliQ o TE 0,5 X. (para cultivo puro)
o 100 - 200 µl de TE 0,5 X (para LR).
- s) Conservar congelado a -20 °C.

8. RESIDUOS

Los residuos que se generan contienen fenol y por ello deben de ser eliminados en envases debidamente identificados.

9. REFERENCIAS

No aplica.

10. ESQUEMA

No aplica.

Cuantificación de *Streptococcus bovis* y *Megasphaera elsdenii* mediante PCR a tiempo real CAA/TA/0031-00 (En revisión)

1. INTRODUCCIÓN

Este documento describe el procedimiento normalizado de trabajo (PNT) para la cuantificación de las bacterias ruminales *Streptococcus bovis* y *Megasphaera elsdenii* mediante PCR a tiempo real. La amplificación por PCR a tiempo real del DNA extraído de la muestra mediante *primers* y sonda *TaqMan-MGB* específicos de *Streptococcus bovis* y *Megasphaera elsdenii* permite detectar la presencia de material en las muestras. Los diseños específicos se han realizado mediante la secuencia de 16S DNA ribosomal, disponible en la base de datos del GeneBank, y los fragmentos amplificados son de 84 y 129 pb (pares de bases), respectivamente.

2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

La metodología descrita es la que se realiza con muestras de DNA de líquido ruminal en el Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).

3. DEFINICIONES

qPCR: PCR a tiempo real.

4. CUALIFICACIÓN DEL PERSONAL

El personal del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos que tenga como mínimo el nivel de cualificación D según la clasificación descrita en el capítulo 6 del Manual de Calidad del Departamento, que haya sido debidamente entrenados y figure como personal autorizado en la libreta de los equipos correspondientes.

5. RESPONSABILIDADES

- a. Los usuarios que realicen esta técnica son responsables de leer este PNT y firmar en el registro de lectura de éste, trabajar correctamente y con precaución.
- b. El responsable de esta técnica ha sido asignado por el jefe del servicio o proyecto y se le reconoce el conocimiento del método y la

responsabilidad de elaborar este PNT. Además debe procurar que el personal que la realice esté capacitado y conozca el PNT.

- c. El responsable del proyecto o servicio es el responsable de la aprobación de este PNT y de su difusión entre los miembros del grupo que vayan a seguirlo. Además es el responsable de asignar un responsable de la técnica y de colaborar con él en mantener el PNT actualizado.
- d. La *Unitat de Garantia de Qualitat* es responsable de verificar el cumplimiento de este PNT.

6. NIVEL DE RIESGO

La realización de este proceso no supone ningún riesgo especial para el individuo, salvo el **riesgo físico** que supone el uso de aparatos eléctricos..

Será necesario usar guantes para evitar la contaminación de las muestras. También con la finalidad de prevenir la contaminación de las muestras con DNA, las reacciones de qPCR se harán en un laboratorio diferente al usado para la extracción de DNA.

7. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO:

a. Material y reactivos

I. EQUIPAMIENTO

- Vórtex
- Microcentrífuga
- Centrífuga de placas
- Termociclador (*ABI PRISM 7900 HT: Sequence Detection System, Applied Biosystems*)
- Pipetas de qPCR
- Gradilla de eppendorfs
- Gradilla negra para placa de 96 pocillos
- Rotulador permanente S o L

II. MATERIAL FUNGIBLE

- Tubos estériles de 1,5 ml (tipo *Eppendorf*)
- Puntas con filtro (anti-aerosoles) estériles libres de RNasas y DNasas de 100 µl y 200 µl
- Placas ópticas de 96 pozos (*Applied Biosystems*)
- Film adhesivo (*Optic adhesive cover, Applied Biosystems*)

III. REACTIVOS

- *Primers* y sonda *TaqMan-MGB* específicos de *Streptococcus bovis*:
 - *S.bovis* F (forward): 5'-GATAGCTAATACCGCATAACAGCATT-3'
 - *S.bovis* R (reverse): 5'-AACGCAGGTCCATCTACTAGTGAA-3'
 - *S.bovis* P (*TaqMan-MGB*): FAM-5'-TGCTCCTTTCAAGCAT-3'

- *Primers* y sonda *TaqMan-MGB* específicos de *Megasphaera elsdenii*:
 - *MelsF* (forward): 5'-GACCGAAACTGCGATGCTAGA-3'
 - *MelsR* (reverse): 5'-CGCCTCAGCGTCAGTTGTC-3'
 - *Melsprobe* (*TaqMan-MGB*): FAM-5'-ACTGGTGTTCCCTCCTAATA-3'

- TaqMan Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystems*)
- Agua milliQ estéril

IV. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

- *Mix Real-Time PCR* (20 µl de mix por reacción):

	(x1 muestra)
<i>TaqMan Universal PCR Master Mix</i> (2X)	10 µL
Taqman probe 5 µM (20x)	1 µL
Primer forward 9 µM (10x)	2 µL
Primer reverse 9 µM (10x)	2 µL
 volum final	 15 µL

El volumen de mix a preparar se tiene que determinar cada vez en función del número de reacciones a realizar, se tiene que tener en cuenta que es necesario preparar en exceso (aproximadamente un 10% en exceso).

- *Concentración final de los reactivos en las PCR:*
TaqMan Universal PCR Master Mix 1x, primers 900 nM (cada uno) y sonda TaqMan-MGB 250 nM.

b. Procedimiento

I.OBSERVACIONES PRELIMINARES

- Utilizar siempre guantes (limpios y nuevos!).
- No exponer ninguna parte del cuerpo a la luz UV, ni tampoco los reactivos o el DNA.
- No hablar cuando se trabaja en la cabina de flujo para no contaminar.
- Utilizar siempre puntas con filtro.

II.PREPARACIÓN DEL MATERIAL

- a) Limpiar la campana con alcohol y papel trapicel.
- b) Colocar el material encima la campana:
 - Cajas de puntas abiertas.
 - Bote de tubos eppendorfs medio desenroscado.
 - Pipetas colocadas con la punta hacia arriba.
 - Placas de 96 pozos dentro de su bolsa.
 - Gradillas limpias con alcohol y papel.
- c) Irradiar con luz UV durante unos 10 min.
- d) Apagar la luz UV.
- e) Preparar los reactivos siguientes:
 - Descongelar los Primers Forward y Reverse 9 μ M que están en el congelador
 - Descongelar la Sonda Taqman 5 μ M (congelada y protegida de la luz)
 - Descongelar la curva estándar de DNA (congelador)

- Descongelar las muestras de DNA de líquido ruminal (20 ng/ μ L, congelador)
 - Recoger H₂O milliQ autoclavada
- f) Hacer pico de centrífuga – vórtex – pico de centrífuga con cada uno de estos materiales.
- g) Guardarlos en la nevera hasta su uso, cuando se utilicen volver a hacer vórtex y pico de centrífuga.

III. PREPARACIÓN DE LA REACCIÓN Y DE LAS PLACAS

- a) Rotular los eppendorfs con el n° de pocillos que corresponden
- a. N° eppendorfs = 1 NTC + 7 curva std + N° muestras DNA LR + 1 MIX
 - b. ¿Cuántos pocillos por muestra?
 - i. Los NTC y la curva std siempre por triplicado
 - ii. Muestras DNA: duplicado o triplicado. Si se hacen por duplicado caben un máximo de 36 muestras por placa, y si se hacen por triplicado 24.
- b) Preparar la MIX:
- La Mix se prepara como está descrito en el apartado 7.1.4.a. El volumen de MIX a preparar se determina en función del número de pocillos a utilizar, siempre preparar en exceso con un margen de seguridad (+10-15%).
- a. Un vez preparada la MIX hacer pico de centrífuga – vórtex – pico de centrífuga!!!
 - b. Repartir la MIX en los eppendorfs sin cambiar de punta:
 - i. Muestras triplicadas: 49,5 μ L/eppendorf
 - ii. Muestras duplicadas: 33 μ L/eppendorf
- c) Repartir los DNA en los eppendorfs que correspondan, cambiando las puntas:
- a. Muestras triplicadas: 16,5 μ L/eppendorf (5 μ L x 3 + margen de seguridad)
 - b. Muestras duplicadas: 11 μ L/eppendorf (5 μ L x 2 + margen de seguridad)
 - c. Hacer de cada eppendorf: pico de centrífuga – vórtex – pico de centrífuga!!!

- d) Rellenar la placa de 96 pozos y colocarla con mucho cuidado y sólo tocando la parte inferior encima la gradilla negra de 96 pocillos para dar estabilidad.
 - a. Es necesario poner 20 μL del contenido del eppendorf en cada pocillo (15 μL MIX + 5 μL DNA).
 - b. Cada vez que cambiamos de eppendorf tenemos que cambiar de punta.
- e) Sellar la placa utilizando la película adhesiva, pasar la “lengua de plástico” para marcar filas y columnas 2 veces.
- f) Centrifugar la placa utilizando la opción “short” hasta unas 1000 rpm. Mirar si queda alguna burbuja (no puede quedar!). Para eliminar las burbujas desacerlas agitando el pocillo con los dedos.
- g) Volver a centrifugar.
- h) Colocar la placa en el ABI Prism como está descrito en **VGM/EQ/0006 ABIPRISM 7900 HT: Funcionamiento y preparación de muestras.**
- i) Si tardamos mucho en colocar la placa en el equipo guardar la placa de la luz con papel trapicel y ponerla en la nevera. Antes de colocarla en el aparato hacer un pico de centrífuga.

c. *Real-Time PCR*

Las reacciones de qPCR se realizarán con 100 ng de DNA de la muestra extraída como se describe en **CAA/TA/0026- Extracción de ADN en líquido ruminal.**

Realizaremos cuatro tipos de reacciones diferentes:

- NTC (*Non Template Control*) o control negativo de PCR: no contiene DNA, se realiza con agua milliQ.
- Curva estándar: 100000, 10000, 1000, 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 pg de DNA.
- Muestras a analizar: 100 ng de DNA de la muestra.

Las reacciones de amplificación se preparan como se describe en la tabla siguiente y usando la *Mix* de *Real-Time* que se detalla en el apartado 7.1.4.a. El volumen final de reacción es de 20 μL :

	Mix (μ l)	agua milliQ (μ l)	DNA muestra (2 ng/ μ l)	DNA (20ng/ μ l)	DNA (2ng/ μ l)	DNA (200pg/ μ l)	DNA (20pg/ μ l)	DNA (2pg/ μ l)	DNA (0.2pg/ μ l)	DNA (0.02pg/ μ l)	DNA (0.002 pg/ μ l)	Vol. final (μ l)
NTC	15	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
C. estándar												
100000 pg <i>Sb/Me</i>	15	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	20
10000 pg <i>Sb/Me</i>	15	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	20
1000 pg <i>Sb/Me</i>	15	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	20
100 pg <i>Sb/Me</i>	15	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	20
10 pg <i>Sb/Me</i>	15	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	20
1 pg <i>Sb/Me</i>	15	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	20
0.1 pg <i>Sb/Me</i>	15	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	20
0.01 pg <i>Sb/Me</i>	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	20
Muestras	15	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	20

Las reacciones con el NTC y la curva estándar se harán por triplicado, y las muestras se harán por duplicado.

Las reacciones se montan en placas ópticas de 96 pozos. Para tener lugar la reacción, la placa, previamente centrifugada, se introduce en un termociclador que permite detectar la aparición de amplificación a tiempo real y como se describe en el procedimiento **VGM/EQ/0006- ABI PRISM 7900 HT: preparación de muestras y funcionamiento** . El perfil térmico de las PCR será el siguiente: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 95 °C 15s - 60 °C 1min (40 ciclos).

d. Resultados

Para el análisis de los resultados usaremos el *software* SDS. Las reacciones de PCR realizadas vendrán caracterizadas por su valor de Ct como se describe en **VGM/EQ/0006**.

8. RESIDUOS

Los residuos sólidos generados se tiran en la basura de deshechos.

9. REFERENCIAS

No aplica.

10. ESQUEMA

No aplica.

CAPÍTULO 9

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, M.S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *Journal of Dairy Science*. 80:1447-1462.
- Amann, R.I. and Kuhl, M. 1998. In situ methods for the assessment of microorganisms and their activities. *Current Opinion in Microbiology*. 1:352-358.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Attwood, G., Lockington, R.A., Xue, G.P. and Brooker, J.D. 1988. Use of a unique gene sequence as a probe to enumerate a strain of *Bacteroides rumenicola* introduced into the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 54:534-539.
- Attwood, G., Klieve, A.V., Ouwerkerk, D. and Patel, B.K.C. 1998. Ammonia-hyperproducing bacteria from New Zealand ruminants. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:1796-1804.
- Avaniss-Aghajani, E., Jones, K., Holtzman, A., Aronson, T., Glover, N., Boian, M., Froman, S. and Brunk, C.F. 1996. Molecular technique for rapid identification of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 34:98-102.
- Bach, A. 2002. Trastornos ruminales en el vacuno lechero: un enfoque práctico. En: XVIII Curso de Especialización FEDNA, Expoaviga, Barcelona, España.
- Bach, A., Iglesias, C. and Busto, I. 2004. Technical note: a computerized system for monitoring feeding behavior and individual feed intake of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 87:4207-94209.
- Bach, A., Iglesias, C. and Devant, M. 2007. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Animal Feed Science and Technology*. 136:156-163.

- Bacha, F. 2002. Nutrición, patología digestiva y salud intestinal rumiantes en cebo; aspectos prácticos. En: XVIII Curso de Especialización FEDNA, Expoaviga, Barcelona, España.
- Baile, C.A., McLaughlin, C.L., Potter, E.L. and Chalupa, W. 1979. Feeding behaviour changes of cattle during introduction of monensin with roughage or concentrate diets. *Journal of Animal Science*. 48:1501-1508.
- Balandrin, M.F. and Klocke, J.A. 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science*. 228:1154-1160.
- Barry, T.N. and Duncan, S.J. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 1. Voluntary intake. *British Journal of Nutrition*. 51:485-491.
- Batajoo, K.K. and Shaver R.D. 1994. Impact of nonfiber carbohydrate on intake, digestion, and milk production by dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 77:1580-1588.
- Bauchop, T. 1979. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. *Applied and Environmental Microbiology*. 38:148-158.
- Bauer, M.L., Herold, D.W., Britton, R.A., Stock, R.A., Klopfenstein, T.J. and Yates, D.A. 1995. Efficacy of laidlomycin propionate to reduce ruminal acidosis in cattle. *Journal of Animal Science*. 73:3445-3454.
- Bauman, D.E. and Griinari, J.M. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition*. 23:203-227.
- Beauchemin, K.A., Yang, W.Z., Morgavi, D.P., Ghorbani, G.R., Kautz, W. and Leedle, J.A.Z. 2003. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 81:1628-1640.
- Beckman, J.L. and Weiss, W.P. 2005. Nutrient digestibility of diets with different fiber to starch ratios when fed to lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 88:1015–1023.

- Beharka, A.A., Nagaraja, T.G. and Morrill, J.L. 1991. Performance and ruminal function development of young calves fed diets with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. *Journal of Dairy Science*. 74:4326-4336.
- Beharka, A.A. and Nagaraja, T.G. 1998. Effect of *Aspergillus oryzae* extract alone or in combination with antimicrobial compounds on ruminal bacteria. *Journal of Dairy Science*. 81:1591–1598.
- Bergen, W.G. and Bates, D.B. 1984. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. *Journal of Animal Science*. 58:1465-1483.
- Beuchat, L.R. 1994. Antimicrobial properties of spices and their essential oils. In: *Natural antimicrobial systems and food preservation*. P.167-179. Dillon, V.M. and Board, R.G., ed. CAB International, Wallingford and New York, NY, USA.
- Beauchemin, K.A., Yang, W.Z., Morgavi, D.P., Ghorbani, G.R., Kautz, W. and Leedle, J.A. 2003. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *Animal Science*. 81:1628-1640.
- Bevans, D.W., Beauchemin, K.A., Schwartzkopf-Genswein, K.S., McKinnon, J.J. and McAllister, T.A. 2005. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 83:1116-1132.
- Blanch, M., Calsamiglia, S., DiLorenzo, N. and DiConstanzo, A. 2006. Effects of feeding polyclonal antibody preparation against *Streptococcus bovis* on rumen fermentation of rapid grain adapted heifers. *Journal of Dairy Science*. 89(Suppl. 1):128 (Abstract).
- Blanch, M., Calsamiglia, S. and Castelló, A. 2007. Quantification of *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii* in ruminal fluid of dairy cows and beef heifers by real time PCR technique. *Journal of Dairy Science* 90(Suppl. 1):339 (Abstract).

- Boerner, B.J., Byers, F.M., Schelling, G.T., Coppock C.E. and Greene L.W. 1987. Trona and sodium bicarbonate in beef cattle diets: effects on pH and volatile fatty acid concentrations. *Journal of Animal Science*. 65:309-316.
- Brent, B.E. 1976. Relationship of acidosis to other feedlot ailments. *Journal of Animal Science*. 43:930-935.
- Brock, T.D. 1987. The study of microorganisms in situ: progress and problems. *Symposium of Society for General Microbiology*. 41:1-17.
- Brooker, J.D., Odonovan, L.A., Skene, I., Clarke, K., Blackall, L. and Muslera, P. 1994. *Streptococcus caprinus* sp. nov, a tannin-resistant ruminal bacterium from feral goats. *Letters in Applied Microbiology*. 18:313-318.
- Brookman, J.L., Mennim, G., Trinci, A.P., Theodorou, M.K. and Tuckwell, D.S. 2000. Identification and characterization of anaerobic gut fungi using molecular methodologies based on ribosomal ITS1 and 18S rRNA. *Microbiology*. 146:393-403.
- Brossard, L., Martin, C., Chaucheyras-Durand, F. and Michalet-Doreau, B. 2004. Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. *Reproduction Nutrition Development*. 44:195-206.
- Brown, M.S., Ponce, C.H. and Pulikanti, R. 2006. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: performance and ruminal metabolism. *Journal of Animal Science*. 84:E25-E33.
- Bunting, L.D., Howard, M.D., Muntifering, R.B., Dawson, K.A. and Boling, J.A. 1987. Effect of feeding frequency on forage fiber and nitrogen utilization in sheep. *Journal of Animal Science*. 64:1170-1177.
- Burrin, J.M. and Price, C.P. 1985. Measurement of blood glucose. *Annals of Clinical Biochemistry*. 22:327-42.
- Burrin, D.G. and Britton, R.A. 1986. Response to monensin in cattle during subacute acidosis. *Journal of Animal Science*. 63:888-893.

- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potencial applications in foods—A review. *International Journal of Food Microbiology*. 94:223–253.
- Caja, G., González, E., Flores, C., Carro, M.D. and Albanell, E. 2003. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. En: XIX Curso de Especialización FEDNA, Madrid, España.
- Callaway, E.S. and Martin, S.A. 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *Journal of Dairy Science*. 80:2035–2044.
- Callaway, T.R., Adams, K.A. and Russell, J.B. 1999. The ability of “low G+C gram-positive” ruminal bacteria to resist monensin and counteract potassium depletion. *Current Microbiology*. 39:226-230.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L. and Ferret, A. 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90:2580-2595.
- Calsamiglia, S., Cardozo, P.W., Ferret, A. and Bach, A. 2008. Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *Journal of Animal Science*. 86:702-711.
- Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Kamel, C. 2006. Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. *Journal of Animal Science*. 84:2801-2808.
- Carro, M.D. and Ranilla, M.J. 2003. Effect of the addition of malate on in vitro rumen fermentation of cereal grains. *British Journal of Nutrition*. 89:181-188.
- Castillo, M., Martin-Orue, S.M., Manzanilla, E.G., Badiola, I., Martin, M. and Gasa, J. 2005. Quantification of total bacteria, enetrobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Veterinary Microbiology*. 114:165-170.

- Cerrato-Sánchez, M. 2007. Estudio de los efectos del pH y sus fluctuaciones sobre la fermentación microbiana ruminal y el flujo de nutrientes en un sistema de doble flujo continuo. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis doctoral.
- Cerrato-Sánchez, M., Calsamiglia, S. and Ferret, A. 2007. Effects of timr at suboptimal pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *Journal of Dairy Science*. 90:1486-1492.
- Cerrato-Sánchez, M., Calsamiglia, S. and Ferret, A. 2007. Effects of patterns of suboptimal pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *Journal of Dairy Science*. 90:4368-4377.
- Cerrato-Sánchez, M., Calsamiglia, S. and Ferret, A. 2008. Effect of the magnitude of the decrease of rumen pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *Journal of Animal Science*. 86:378-383.
- Chalupa, W., Corbett, W. and Brethour, J.R. 1980. Effects of monensin and amicloral on rumen fermentation. *Journal of Animal Science*. 51:170-179.
- Chaney, A.L. and Marbach, E.P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*. 8:130-132.
- Chao, S.C. and Young, D.G. 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*. 12:639-649.
- Chaucheyras, F., Fonty, G., Bertin, G. and Gouet, P. 1995. Effects of live *Saccharomyces cerevisiae* cells on zoospore germination, growth, and cellulolytic activity of the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis* MCH3. *Current Microbiology*. 31:201-205.
- Chaucheyras, F., Fonty, G., Bertin, Salmon, J.M. and Gouet, P. 1996. Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell SC1), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism in vitro. *Canadian Journal of Microbiology*. 42:927-933.

- Chaucheyras-Durand, F., Walker, N.D. and Bach, A. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. *Animal Feed Science and Technology*. 145:5-26.
- Cheeke, P.R. 1996. Biological effects of feed and forage saponins and their impacts on animal production. *Advances in Experimental Biology*. 405:377-385.
- Church, D.C. 1988. *The ruminant animal-Digestive physiology and nutrition*. Prentice Hall, New Jersey, NJ, USA.
- Coe, M.L., Nagaraja, T.G., Sun, Y.D., Wallace, N., Towne, E.G., Kemp, K.E. and Hutcheson, J.P. 1999. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. *Journal of Animal Science*. 77:2259-2268.
- Collins, M.D. and Gibson, G.R. 1999. Probiotics, prebiotics, and symbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American journal of clinical nutrition*. 69:1052S-1057S.
- Counotte, G.H.M., Prins, R.A., Janssen, R.H.A.M. and DeBie, M.J.A. 1981. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-¹³C]lactate in the rumen of dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. 42:649-55.
- Counotte, G.H.M., Lankhorst, A. and Prins, R.A. 1983. Role of DL-lactic acid as an intermediate in rumen metabolism of dairy cows. *Journal of Animal Science*. 56:1222-35.
- Cullen, A.J., Harmon, D.L. and Nagaraja, T.G. 1986. In vitro fermentation of sugars, grains, and by-product feeds in relation to initiation of ruminal lactate production. *Journal of Dairy Science*. 69:2616-2621.
- Curtin, CH.B., Mottet, N.K., Pontecorvo, G. and Sistrun, W.R. 1991. *Diccionario de Ciencias*. P. 996. Mc Graw-Hill, Madrid, España.
- Davis, B.D., Dubelcco, R., Eisen, H.N. and Ginsberg, H.S. 1984. Bases de la quimioterapia. In: *Tratado de Microbiología*. P. 94-106. 3rd ed. Salvat Editores, S.A., Barcelona, España.

- Dawson, K.A. and Boling, J. 1987. Effects of potassium ion concentrations on the antimicrobial activities of ionophores against ruminal anaerobes. *Applied and Environmental Microbiology*. 53:2363–2367.
- Dawson, K.A. and Allison, M.J. 1988. Digestive disorders and nutritional toxicity. In: *The rumen microbial ecosystems*. Ed. P. N. Hobson. P. 129-150. P. N. Hobson. Elsevier Science Publisher. London, UK.
- Dawson, K.A., Newman, K.E. and Boling, J.A. 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. *Journal of Animal Science*. 68:3392-3398.
- Dehority, B.A. 1993. *Laboratory Manual for Classification of Rumen Ciliate Protozoa*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Dehority, B.A. and Orpin, C.G. 1988. Development of, and natural fluctuations in rumen microbial populations. In: *The rumen microbial ecosystems*. P. 129-150. Ed. P. N. Hobson. Elsevier Science Publisher. London, UK.
- Denman, S.E. and McSweeney, C.S. 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiology Ecology*. 58:572-582.
- Dennis, S.M., Nagaraja, T.G., and Bartley, E.E. 1981. Effects of lasalocid and monensin on lactate-producing or-using rumen bacteria. *Journal of Animal Science*. 52:418-426.
- Devant, M., Ferret, A., Gasa, J., Calsamiglia, S. and Casals, R. 2000. Effects of protein concentration and degradability on performance, ruminal fermentation, and nitrogen metabolism in rapidly growing heifers fed high-concentrate diets from 100 to 230 kg body weight. *Animal Science*. 78:1667-1676.
- Devant, M. and Bach, A. 2004. Effect of malate supplementation on rumen fermentation and milk production in postpartum cows. *Journal of Dairy Science*. 87(Suppl. 1):47 (Abstract).

- DiLorenzo, N., Gill, R.K., Diez-Gonzalez, F., Larson, J.E. and DiCostanzo, A. 2005. Response by stress fed high-forage diets to oral doses of a polyclonal antibody preparation against *Streptococcus bovis* on target bacteria populations and rumen fermentation products. *Journal of Dairy Science* 88 (Suppl. 1):51 (Abstract).
- DiLorenzo, N., Diez-Gonzalez, F. and DiCostanzo, A. 2006. Effects of feeding polyclonal antibody preparations on ruminal bacterial populations and ruminal pH of steers fed high-grain diets. *Journal of Animal Science*. 84:2178-2185.
- DiLorenzo, N., Dahlen, C.R., Diez-Gonzalez, F., Lamb, G.C., Larson, J.E. and DiCostanzo, A. 2008. Effects of feeding polyclonal antibody preparations on rumen fermentation patterns, performance, and carcass characteristics of feedlot steers. *Journal of Animal Science*. 86:3023:3032.
- Dirksen, G. 1970. Acidosis in A.T. Phillipson (Ed) *Proceedings of the 3rd International Symposium on the Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*. Oriel Press, Newcastle, UK.
- Dirksen, G.U., Liebich, H.G., and Mayer, E. 1985. Adaptive changes of the ruminal mucosa and their functional and clinical significance. *Bovine Practitioners*. 20:116.
- Dobson, M.J., Brown, W.C.B., Dobson, A. and Phillipson, A.T. 1956. A histological study of the organisation of the rumen epithelium of sheep. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. 41:247–253.
- Doré, J. and Stahl, D.A. 1991. Phylogeny of anaerobic rumen Chytridiomycete inferred from small subunit ribosomal RNA sequence comparisions. *Canadian Journal of Botany*. 69:1964-1971.
- Dorman, H.J.D. and Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88:308-316.
- Dougherty, R.W., Riley, J.L., Baetz, A.L., Cook, H.M. and Coburn, K.S. 1975. Physiologic studies of experimentally grain-engorged cattle and sheep. *American Journal of Veterinary Research*. 36:833–835.

- Duval, S.M., McEwan, N.R., Graham, R.C., Wallace, R.J. and Newbold, C.J. 2007. Effect of a blend of essential oil compounds on the colonization of starch-rich substrates by bacteria in the rumen. *Journal of Applied Microbiology*. 103:2132-2141.
- Emmanuel, B., Lawlor, M.J. and McAleese, D.M. 1969. The rumen buffering system of sheep fed pelleted roughage-concentrate rations. *British Journal of Nutrition*. 23:805-811.
- Erdman, R.A. 1988. Dietary buffering requirements of the lactating dairy cow: a review. *Journal of Dairy Science*. 71:3246-3266.
- Erdman, R.A., Botts, R.L., Hemken, R.W. and Bull, L.S. 1980. Effect of dietary sodium bicarbonate and magnesium oxide on production and physiology in early lactation. *Journal of Dairy Science*. 63:923-930.
- Erdman, R.A., Hemken, R.W. and Bull, L.S. 1982. Dietary sodium bicarbonate and magnesium oxide for early postpartum lactating dairy cows: Effects on production, acid-base metabolism, and digestion. *Journal of Dairy Science*. 65:712-731.
- Erickson, G.E., Milton, C.T., Fanning, K.C., Cooper, R.J., Swingle, R.S., Parrott, J.C., Vogel, G. and Klopfenstein, T.J. 2003. Interaction between bunk management and monensin concentration on finishing performance, feeding behavior, and ruminal metabolism during an acidosis challenge with feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 81:2869-2879.
- Finlay, B.J., Esteban, G., Clarke, K.J., Williams, A.G., Embley, T.M. and Hirt, R.P. 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters*. 117:157-162.
- France, J. and Siddons, R.C. 1993. Volatile fatty acid production. In: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. P. 110. J. M. Forbes and J. France, CAB International, New York, USA.

-
- French, N. and Kennely, J.J. 1990. Effects of feeding frequency on ruminal parameters, plasma insulin, milk yield, and milk composition in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 73:1857-1863.
- Fuller, R. 1989. A review: probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66:365-378.
- Galbraith, E.A., Antonopoulos, D.A. and White, B.A. 2004. Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying genetic diversity in an environmental metagenome: the rumen as a model. *Environmental Microbiology*. 6:928-37.
- Garret, E.F., Nordlund, K.V., Goodger, W.J. and Oetzel, G.R. 1997. A cross-sectional field study investigating the effect of periparturient dietary management on ruminal pH in early lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 80(Suppl.1):169 (Abstract).
- Gerhenson, J. and Croteau, R. 1991. Terpenoids. In herbivores: their interactions with secondary plant metabolites, volume 1. P.165-219. Rosenthal, G.A. and Berenbaum, M.R., ed. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Ghorbani, G.R., Jackson, J.A. and Hemken, R.W. 1989. Effects of sodium bicarbonate and sodium sesquicarbonate on animal performance, ruminal metabolism, and systemic acid-base status. *Journal of Dairy Science*. 72:2039-2045.
- Ghorbani, G.R., Morgavi, D.P., Beauchemin, K.A. and Leedle, J.A.Z. 2002. Effects of direct-fed microbials on rumen fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 80:1977-1985.
- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125:1401-1412.
- Gill, H.S., Shu, Q. and Leng, R.A. 2000. Immunization with *Streptococcus bovis* protects against lactic acidosis in sheep. *Vaccine*. 18:2541-2548.

- Ginzinger, D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*. 30:503-512.
- Gnanasampanthan, G. 1993. Ph.D. thesis: Immune responses of sheep to rumen ciliates and the survival and activity of antibodies in the rumen fluid., University of Adelaide, Adelaide, USA.
- Goad, D.W., Goad, C.L. and Nagaraja, T.G. 1998. Ruminant microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *Journal of Animal Science*. 76:234-241.
- González, L.A. 2005. Tesina de máster: Efecto de la dosis de bicarbonato sódico en piensos para terneras en cebo intensivo sobre la ingestión de materia seca, el consumo de agua y la fermentación ruminal. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, España.
- Griffin, S.G., Wyllie, S.G., Markham, J.L. and Leach, D.N. 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*. 14:322-332.
- Grubb, J.A. and Dehority, B.A. 1975. Effects of an abrupt change in ration from all roughage to high concentrate upon rumen microbial numbers in sheep. *Applied Microbiology*. 30:404-412.
- Gueimonde, M., Tolkkio, S., Korpimäki, T. and Salminen, S. 2004. New Real-Time Quantitative PCR Procedure for Quantification of Bifidobacteria in Human Fecal Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 4165-4169.
- Guffanti, A.A, Davidson, L.F., Mann, T.M. and Krulwich, T.A. 1979. Nigericin-induced death of an acidophilic bacterium. *Journal of General Microbiology*. 114:201-206.
- Gutmann, I. and Bergmeyer, H.U. 1974. Determination of urea with glutamate dehydrogenase as indicator enzyme. 2nd edition. P. 1794-1798. Academic Press, New York, NY, USA.

- Haarman, M. and Knol, J. 2005. Quantitative real-time PCR Assays to identify and quantify fecal Bifidobacterium species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:2318-2324.
- Harmison, B., Eastridge, M.L. and Firkins, J. L. 1997. Effect of percentage of dietary forage neutral detergent fiber and source of starch on performance of lactating Jersey cows. *Journal of Dairy Science*. 80:905–911.
- Harmon, D.L., Britton, R.A., Prior, R.L. and Stock, R.A. 1985. Net portal absorption of lactate and volatile fatty acids in steers experiencing glucose-induced acidosis or fed a 70% concentrate diet ad libitum. *Journal of Animal Science*. 60:560-569.
- Heinrichs, J. 2005. Rumen development in the dairy calf. *Advances in Dairy Technology*. 17:179-187.
- Helander, I.M., Alakomi, H., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M. and Wright, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:3590-3595.
- Hernández-Bermúdez, J. 2002. Publicado en: Alonso Díez A.J., González Montaña J.R., Rejas López J. Congreso de la Sociedad Española de Medicina Interna Veterinaria. [cd-rom]. P. 96-102. Universidad de León, León, España.
- Hicks, R., Amann, R.I. and Stahl, D.A. 1992. Dual staining of natural bacterioplankton with 4', 6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:2158-2163.
- Hobson, P.N., Mann, S.O. and Oxford, A.E. 1958. Some studies on the occurrence and properties of a large Gram-negative coccus from the rumen. *Journal of General Microbiology*. 19:462-472.
- Hristov, A.N., Ivan, M., Rode, L.M. and McAllister, T.A. 2001. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets. *Journal of Animal Science*. 79:515-24.

- Hungate, R.E. 1966. The Rumen and its microbes P. 60-64. Academic press, New York, NY, USA.
- Huntington, G.B., Prior, R.L. and Britton, R.A. 1980. Glucose and lactate absorption and metabolic interrelationships in lambs switched from low to high concentrate diets. *Journal of Nutrition*. 110:1904-1913.
- Huntington, G.B. 1988. Nutritional problems related to the gastrointestinal tract. Acidosis. In: D. C. Church (Ed.) *The Ruminant Animal*. P. 474-480. Waveland Press, Prospect Heights, IL, USA.
- Huws, S.A., Edwards, J.E., Kim, E.S. and Scollan, N.D. 2007. Specificity and sensitivity of eubacterial primers utilized for molecular profiling of bacteria within complex microbial ecosystems. *Journal of Microbiological Methods*. 70:565-569.
- Jouany, J.P. 1982. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentation contents. *Sciences des Aliments*. 2:131-144.
- Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F. and Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*. 76:626-631.
- Kaufmann, W. 1976. Influence of the composition of the ration and the feeding frequency on pH-regulation in the rumen and on feed intake in ruminants. *Livestock Production Science*. 3:103-114.
- Kay, R.N.B. 1966. The influence of saliva on digestion in ruminants. *World Review of Nutrition and Dietetics*. 6:292.
- Kleen, J.L., Hooijer, G.A., Rehage, J., and Noordhuizen, J.P. 2003. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *Journal of Veterinary Medicine*. 50:406-414.
- Kleen, J.L. 2004. PhD Thesis: Prevalence of subacute ruminal acidosis in Dutch dairy herds – A field study. Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany.

- Klieve, A.V., Hennessy, D., Ouwerkerk, D., Forster, R.J., Mackie, R.I. and Attwood, G.T. 2003. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. *Journal of Applied Microbiology*. 95:621-630.
- Kocherginskaya, S.A., Simpson, J.M. and White, B.A. 1997. Microbial community structure of the rumen as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis of polymerase chain-reaction amplified 16S rDNA genes. *Evolution of the Rumen Microbial Ecosystem*. P. 37. RRI-INRA Rumen Microbiology Symposium.
- Kohn, R.A. and Dunlap, T.F. 1998. Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and in vitro. *Journal of Animal Science*. 76:1702-1709.
- Koike, S. and Kobayashi, Y. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*. 204:361-366.
- Konstantinov, S.R., Smidt, H. and de Vos, W.M. 2005. Representational Difference Analysis and Real-Time PCR for Strain-Specific Quantification of *Lactobacillus sobrius* sp.nov. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:7578-7581.
- Krause, D.O. and Russell, J. 1996. An rRNA approach for assessing in the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid deamination. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:815-821.
- Krause, D.O., Smith, W.J.M., Conlan, L.L., Gough, J.M., Williamson, M.A. and McSweeney, C.S. 2003. Diet influences the ecology of lactic acid bacteria and *Escherichia coli* along the digestive tract of cattle: neural networks and 16S rDNA. *Microbiology*. 149:57-65.
- Krehbiel, C.R., Rust, S.R., Zhang, G. and Gilliland, S.E. 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *Journal of Animal Science*. 81(E. Suppl. 2):E120–E132.
- Kung, L., Huber, J.T., Krummrey, J.D., Allison, L. and Cook, R.M. 1982. Influence of adding malic acid to dairy cattle rations on milk production, rumen volatile

- acids, digestibility, and nitrogen utilization. *Journal of Dairy Science*. 65:1170–1174.
- Kung, L. and Hession, A.O. 1995. Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *Journal of Animal Science*. 73:250-256.
- Lana, R.P, Russell, J.B. and Van Amburgh, M.E. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *Journal of Animal Science*. 76:2190-2196.
- Le Ruyet, P. And Tucker, W.B. 1992. Ruminal buffers: temporal effects on buffering capacity and pH of ruminal fluid from cows fed high concentrate diet. *Journal of Dairy Science*. 75:1069-1077.
- Leedle, J.A.Z., Bryant, M.P. and Hespell, R.B. 1982. Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low- or high-forage diets. *Applied and Environmental Microbiology*. 44:402-412.
- Lemosquet, S., Rigout, S., Bach, A., Rulquin, H. and Blum, J.W. 2004. Glucose metabolism in lactating cows in response to isoenergetic infusions of propionic acid or duodenal glucose. *Journal Dairy Science*. 87:1767–1777.
- Lila, Z.A., Mohammed, N., Yasui, T., Kurokawa, Y., Kanda, S. and Itabashi, H. 2004. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro. *Journal of Animal Science*. 82:1847-1854.
- Lin, C.Z., Raskin, L. and Stahl, D.A. 1997. Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: Comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*. 60:3236-3244.
- Linehan, B., Scheifinger, C.C. and Wolin, M.J. 1978. Nutritional requirements of *Selenomonas ruminantium* for growth on lactate, glycerol, or glucose. *Applied and Environmental Microbiology*. 35:317-322.

- Littell, R.C., Henry, P.R. and Ammerman, C.B. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Science*. 75:1216-1231.
- Liu, W-T., Marsh, T.L., Cheng, H. and Forney, L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:4516-4522.
- López, S. Valdés, C., Newbold, C.J. and Wallace, R.J. 1999. Influence of sodium fumarate addition on rumen fermentation in vitro. *British Journal of Nutrition*. 81:59-64.
- MacGregor, C.A., Stokes, M.R., Hoover, W.H., Leonard, H.A., Junkins, L.L., Sniffer, C.J. and Mailman, R.W. 1983. Effect of dietary concentration of total nonstructural carbohydrate on energy and nitrogen metabolism and milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 66:39-50.
- Mackie, R.I. and Gilchrist, F.M.C. 1979. Changes in lactate-producing and lactate-utilizing bacteria in relation to pH in the rumen of sheep during stepwise adaptation to a high-concentrate diet. *Applied and Environmental Microbiology*. 38:422-430.
- Mackie, R.I., Aminov, R.I., Gaskins, H.R. and White, B.A. 1999. Molecular microbial ecology in gut ecosystems. *Microbial Biosystems: New Frontiers Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (eds) Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Mackie, R.I., Aminov, R.I., White, B.A. and McSweeney, C.S. 2000. Citado en el capítulo Molecular ecology and diversity in gut microbial ecosystems en *Ruminant physiology: digestión, metabolism, growth and reproduction*. Ed. CABI Publishing, NY, USA.
- Mackie R.I., Aminov R.I., Hu W., Klieve A.V., Ouwkerk D., Sundset M.A. and Kamagata Y. 2003. Ecology of uncultivated *Oscillospira* species in the rumen of

- cattle, sheep, and reindeer as assessed by microscopy and molecular approaches. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:6808-6815.
- Mannarelli, B.M., Evans, S. and Lee, D. 1990. Cloning, sequencing, and expression of a xylanase gene from the anaerobic ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. *The Journal of Bacteriology*. 172:4247-4254.
- Mantovani, H.C. and Russell, J.B. 2001. Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:808-813.
- Marounek, M. and Bartos, S., 1987. Interactions between rumen amyolytic and lactate-utilizing bacteria in growth on starch. *Journal of Applied Bacteriology*. 63:233-238.
- Marounek, M., Fliegrova, K. and Bartos, S. 1989. Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 55:1570-1573.
- Martin, S.A. 1998. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. *Journal of Animal Science*. 76:3123–3132.
- Martin, S.A., Streeter, M.N., Nisbet, D.J., Hill, G.M. and Williams, S.E. 1999. Effects of DL-malate on ruminal metabolism and performance of cattle fed a high-concentrate diet. *Journal of Animal Science*. 77:1008–1015.
- Mathison, B.A., Kelley, K.W. and Davis, W.C. 1984. Quantitation of bovine immunoglobulin G2 antibodies binding *Staphylococcus aureus*, using a murine monoclonal antibody. *American Journal of Veterinary Research*. 45 :2518–2524.
- Meschy, F., Bravo, D. and Sauvant, D. 2004. Analyse quantitative des réponses des vaches laitières à l'apport de substances tampon. *INRA Productions Animales*. 17:11-18.
- Michalet-Doreau, B., Fernandez, I. and Fonty, G.A. 2002. Comparison of enzymatic and molecular approaches to characterize the cellulolytic microbial ecosystems of the rumen and the cecum. *Journal of Animal Science*. 80:790-796.

- Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T. and McNabb, W.C. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 106:3-19.
- Min, B.R., Pinchak, W.E., Anderson, R.C., Fulford, J.D. and Puchala, R. 2006. Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain and in vitro and in vivo bloat precursors in steers grazing winter wheat. *Journal of Animal Science*. 84:2546-2554.
- Minor, D.J., Trower, S.L., Strang, B.D., Shaver, R.D. and Grummer, R.R. 1998. Effects of nonfiber carbohydrate and niacin on periparturient metabolic status and lactation of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 81:189-200.
- Montaño, M.F., Chai, W., Zinn-Ware, T.E. and Zinn, R.A. 1999. Influence of malic acid supplementation on ruminal pH, lactic acid utilization, and digestive function in steers fed high-concentrate finishing diets. *Journal of Animal Science*. 77:780-784.
- Moya, D., Calsamiglia, S., Ferret, A., Fandiño, J.I. and Castillejos, L. 2008. Effects of yeast culture on rumen microbial fermentation of heifers challenged with high-concentrate feeding. *Journal of Animal Science*. 86 (Suppl. 1):589 (Abstarct).
- Nagaraja, T.G., Avery, T.B., Bartley, E.E., Roof, S.K., and Dayton, A.D. 1982. Effect of lasalocid, monensin, or thiopeptin on lactic acidosis in cattle. *Journal of Animal Science*. 54:649-658.
- Nagaraja, T.G. and Taylor, M.B. 1987. Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. *Applied and Environmental Microbiology*. 53:1620-1625.
- Nagaraja, T.G., Towne, G. and Beharka, A.A. 1992. Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed a high-grain diet. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:2410-2414.

- Nagaraja, T.G. and Titgemeyer, E.C. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *Journal of Dairy Science*. 90(E.Suppl. 1):E17-E38.
- Newbold, C.J., Williams, A. and Chamberlain, D.G. 1987. The in vitro metabolism of D,L L-lactic acid by rumen microorganisms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 38:9-18.
- Newbold, C.J., Wallace, R.J. and McIntosh, F.M. 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British Journal of Nutrition*. 76:249-261 .
- Newbold, C.J., McIntosh, F.M., and Wallace, R.J. 1998. Changes in the microbial population of a rumen-simulating fermenter in response to yeast culture. *Canadian Journal of Animal Science*. 78:241-244.
- Nikaido, H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*. 264:382-388.
- Ning, Z., Attwood, G.T., Lockington, R.A. and Brooker, J.D. 1991. Genetic diversity in ruminal isolates of *Selenomonas ruminantium*. *Current Microbiology*. 22:279-284.
- Nisbet, D.J. and Martin, S.A. 1990. Effect of dicarboxylic acids and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on lactate uptake by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56:3515-3518.
- Nisbet, D.J. and Martin, S.A. 1991. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Journal of Animal Science*. 69:4628-4633.
- Nocek, J.E. 1997. Bovine Acidosis: Implications on laminitis. *Journal of Dairy Science*. 80:1005-1028.
- Nocek, J.E. and Russell, J.B. 1988. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *Journal of Dairy Science*. 71:2070-2107.

- Nocek, J.E. and Tamminga, S. 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *Journal of Dairy Science*. 74:3598-3629.
- Nocek, J.E., Kautz, W.P., Leedle, J.A.Z. and Allman, J.G. 2000. Altering diurnal pH and *in situ* digestion in dairy cows with ruminal supplementation of direct fed microbials (DFM) and yeast. *Journal of Dairy Science*. 83(Suppl. 1):1242 (Abstract).
- Nocek, J.E., Kautz, W.P., Leedle, J.A.Z. and Allman, J.G. 2002. Ruminal supplementation of direct-fed microbials on diurnal pH variation and *in situ* digestion in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 85:429-433.
- Nocek, J.E. and Kautz, W.P. 2006. Direct-fed microbial supplementation on ruminal digestion, health, and performance of pre- and postpartum dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 89:260-266.
- Nordlund, K. 2003. Factors that contribute to subacute ruminal acidosis. In: 36th Annual Conference of American Association of bovine practitioners. Columbus, OH, USA.
- NRC (National Research Council). 1996. *Nutrient Requirements of Beef Cattle*, 7th edition. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- NRC (National Research Council). 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th edition. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Oetzel, G.R. 2003a. Introduction to ruminal acidosis in dairy cattle. In: 36th Annual Conference of American Association of Bovine Practitioners. Columbus, OH, USA.
- Oetzel, G.R. 2003b. Nutritional management and subacute ruminal acidosis in dairy herds. In: 36th Annual Conference of American Association of Bovine Practitioners. Columbus, OH, USA.

- Oetzel, G.R. and Nordlund, K.V. 1998. Effect of dry matter intake and feeding frequency on ruminal pH in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 81(Suppl. 1):297 (Abstract).
- Oetzel, G. R., Nordlund, K. V. and Garrett, E. F. 1999. Effect of ruminal pH and stage of lactation on ruminal lactate concentration in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 82(Suppl. 1):38 (Abstract).
- OJEU. 2003. Official Journal of the European Union. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition. Pages L268/29–L268/43 in OJEU of 10/18/2003.
- Orpin, C.G. 1977. On the induction of zoosporogenesis in the rumen phycomyces *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*. *Journal of General Microbiology*. 101:181-189.
- Osawa, R., Fujisawa, T. and Sly, L.L. 1995. *Streptococcus gallolyticus* sp. nov.; gallate degrading organisms formerly assigned to *Streptococcus bovis*. *Systematic and Applied Microbiology*. 18:74-78.
- Ouwerkerk, D., Klieve, A.V. and Forster, R.J. 2002. Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay. *Journal of Applied Microbiology*. 92:753-758.
- Owens, F.N., Secrist, D.S., Hill, W.J. and Gill, D.R. 1998. Acidosis in cattle: A review. *Journal of Animal Science*. 76:275-286.
- Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J. and Olsen, G.J. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in Microbial Ecology*. 9:1-55.
- Paillard, D., McKain, N., Rincon, M.T., Shingfield, K.J., Givens, D.I. and Wallace, R.J. 2007. Quantification of ruminal *Clostridium proteoclasticum* by real-time PCR using a molecular beacon approach. *Journal of Applied Microbiology*. 103:1251-1261.

- Paton, L.J. 2005. Master of Science: Effects of sodium bicarbonate on reducing acidosis in cattle. The University of British Columbia, Canada.
- Plaizier, J.C., Martin, A., Duffield, T., Bagg, R., Dick, P., and McBride, B.W. 2000. Effect of prepartum administration of monensin in a controlled-release capsule on apparent digestibilities and nitrogen utilization in transition cows. *Journal of Dairy Science*. 83:2918-2925.
- Prentice, D.L., Schaefer, D.M. and Oetzel, G.R. 2000. Effect of lasalocid on the forage to concentrate ratio fed to steers maintained at a predetermined daily average ruminal pH. *Journal of Dairy Science*. 83(Suppl. 1):286 (Abstract).
- Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. 2004. Control de microorganismos por agentes físicos y químicos. In: *Microbiología*. P. 145-162. Mc Graw-Hill-Interamericana de España, Madrid, España.
- Puls, W., Keup, U., Krause, H.P., Thomas, G. and Hoffmeister, F. 1977. Glucosidase inhibition. A new approach to the treatment of diabetes, obesity, and hyperlipoproteinaemia. *Naturwissenschaften*. 64:536-537.
- Rabelo, E., Rezende, R.L., Bertics, S.J. and Grummer R.R. 2003. Effects of transition diets varying in dietary energy density on lactation performance and ruminal parameters of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 86:916–925.
- Raeth-Knight, M.L., Linn, J.G. and Jung, H.G. 2007. Effect of direct-fed microbials on performance, diet digestibility, and rumen characteristics of Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 90:1802-1809.
- Ramirez, I. 1992. Does reducing the rate or efficiency of digestion reduce food intake? *The American journal of physiology*. 263:852-856.
- Raskin, L., Capman, W.C., Sharp, R., Poulson, L.K. and Stahl, D.A. 1997. Molecular ecology of gastrointestinal systems. In: Mackie, R.I., White, B.A. and Isaacson, R. (eds) *Gastrointestinal Microbiology*, Vol. 2. P. 243-298. Chapman and Hall, New York.

- Regensbogenova, M., Pristas, P., Javorsky, P., Moon-van der Staay, S.Y., van der Staay, G.W.M., Hackstein, J.H.P., Newbold, C.J. and McEwan, N.R. 2004. Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE. *Letters in Applied Microbiology*. 39:144-147.
- Reilly, K., Carruthers, V.R. and Attwood, G.T. 2002. Design and use of 16S ribosomal DNA-directed primers in competitive PCRs to enumerate proteolytic bacteria in the rumen. *Microbial Ecology*. 43:259-270.
- Requena, T., Burton, J., Matsuki, T., Munro, K., Simon, M.A., Tanaka, R., Watanabe, K. and Tannock, G.W. 2002. Identification, detection, and enumeration of human bifidobacterium species by PCR targeting the transaldolase gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:2420-2427.
- Reynolds, C.K., Dürst, B., Lupoli, B., Humphries, D.J. and Beever, D.E. 2004. Visceral tissue mass and rumen volume in dairy cows during the transition from late gestation to early lactation. *Journal of Dairy Science*. 87:961-971.
- Richardson, A.J., Calder, A.G., Stewart, C.S. and Smith, A. 1989. Simultaneous determination of volatile and non-volatile acidic fermentation products of anaerobes by capillary gas-chromatography. *Letters in Applied Microbiology*. 9:5-8.
- Rotger, A., Ferret, A., Calsamiglia, S. and Manteca, X. 2005. Changes in ruminal fermentation and protein degradation in growing Holstein heifers from 80 to 250 kg fed high-concentrate diets with different forage-to-concentrate ratios. *Animal Science*. 83:1616-1624.
- Rotger, A., Ferret, A., Calsamiglia, S. and Manteca, X. 2006. In situ degradability of seven plant protein supplements in heifers fed high concentrate diets with different forage to concentrate ratio. *Animal Feed Science and Technology*. 125:73-87.
- Russell, J.B. 1987. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and protonmotive force. *Journal of Animal Science*. 64:1519-1525.

- Russell, J.B. 2002. Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. James Russell Publishing Co., Ithaca, NY, USA.
- Russell, J.B. and Dombrowski, D.B. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 39:604-610.
- Russell, J.R., Young, A.W. and Jorgensen, N.A. 1980. Effect of sodium bicarbonate and limestone additions to high grain diets on feedlot performance and ruminal and fecal parameters in finishing steers. *Journal of Animal Science*. 51:996-1002.
- Russell, J.B., Cotta, M.A. and Dombrowski, D.B. 1981. Rumen bacterial competition in continuous culture: *Streptococcus bovis* versus *Megasphaera elsdenii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 41:1394-1399.
- Russell, J.B. and Strobel, H.J. 1989. Effects of additives on in vitro ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. *Journal of Animal Science*. 66:552-558.
- Russell, J.B., O'Connor, J.D., Fox, D.G., Van Soest, P.J. and Sniffen, C.J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *Journal of Animal Science*. 70:3551-3561.
- Russell, J.B. and Chow, J.M. 1993. Another theory for the action of ruminal buffer salts: decreased starch fermentation and propionate production. *Journal of Dairy Science*. 76:826-830.
- Russell, J.B. and Wilson, D.B. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *Journal of Dairy Science*. 79:1503-1509.
- Sauvant, D., Meschy, F. and Mertens, D. 1999. Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Productions Animales*. 12:49-60.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S. and Meschy, F. 2006. Le contrôle de l'acidose ruminale latente *INRA Productions Animales*. 19:69:78.

- Sarwar M., Firkins, J.L. and Eastridge, M.L. 1992. Effects of varying forage and concentrate carbohydrates on nutrient digestibilities and milk production by dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 75:1533-1542.
- Schmidt, J.A., Albright, S., Tsai, K.P., Calza, G.M., ·J. S. Chang and Calza, R.E. 2004. Characterization of *Aspergillus oryzae* fermentation extract effects on the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*, EB 188. Part 1. Zoospore development and physiology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63:422–430.
- Schwab, E.C., Schwab, C.G., Shaver, R.D., Girard, C.L., Putnam, D.E., and Whitehouse, N.L. 2006. Dietary forage and nonfiber carbohydrate contents influence B-vitamin intake, duodenal flow, and apparent ruminal synthesis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 89:174–187.
- Schwartzkopf-Genswein, K.S., Beauchemin, K.A., Gibb, D.J., Crews, D.H., Hickman, D.D.Jr., Streeter, M. and McAllister, T.A. 2003. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. *Journal of Animal Science*. 81:E149-158.
- Seymour, W.M., Campbell, D.R. and Johnson, Z.B. 2005. Relationships between rumen volatile fatty acid concentrations and milk production in dairy cows: a literature study. *Animal Feed Science and Technology*. 119:155-169.
- Sharp, R., Zeimer, C.J., Stern, M.D. and Stahl, D.A. 1998. Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen systems. *FEMS Microbiology Ecology*. 26:71-78.
- Shimizu, M., Fitzsimmons, R.C. and Nakai, S. 1988. Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *Journal of Food Science*. 53:1360-1366.
- Shinkai, T. and Kobayashi, Y. 2007. Localization of ruminal cellulolytic bacteria on plant fibrous materials as determined by fluorescence in situ hybridization and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:1646-1652.

- Shu, Q., Gill, H.S., Hennessy, D.W., Leng, R.A., Bird, S. H., and Rowe, J. B. 1999. Immunisation against lactic acidosis in cattle. *Research in Veterinary Science*. 67:65–71.
- Shu, Q., Gill, H.S., Leng, R.A. and Rowe, J.B. 2000. Immunization with *Streptococcus bovis* vaccine administered by different routes against lactic acidosis in sheep. *The Veterinary Journal*. 159:262-269.
- Sievert, S.J. and Shaver, R.D. 1993a. Carbohydrate and *Aspergillus oryzae* Effects on intake, digestion, and milk production by dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 76:245-254.
- Sievert, S.J. and Shaver, R.D. 1993b. Effect of nonfiber carbohydrate level and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on intake, digestion, and milk production in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science*. 71:1032-1040.
- Sikkema, J., Bont, J.A.M. and Poolman, B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 269:8022-8028.
- Skillman, L.C., Toovey, A.F., Williams, A.J. and Wright, A.D. 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. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:200-206.
- Slyter, L.L., Oltjen, R.R., Kern, D.L. and Blank, F.C. 1970. Influence of type and level of grain and diethylstilbestrol on the rumen microbial populations of steers fed all-concentrate diets. *Journal of Animal Science*. 31:996-1002.
- Slyter, L.L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. *Journal of Animal Science*. 43:910-929.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 26:118-122.
- Sniffen, C.J., Ballard, C.S., Carter, M.P., Cotanch, K.W., Danna, H.M., Grant, R.J., Mandevbu, P., Suekawa, M. and Martin, S.A. 2006. Effects of malic acid on

- microbial efficiency and metabolism in continuous culture of rumen contents and on performance of mid-lactation dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. 127:13–31.
- Speight, S.M. and Harmon, D.L. 2005. Application of carbohydrase inhibitors to moderate rumen fermentation: In vitro evaluation. *Journal of Dairy Science*. 88(Suppl. 1):307 (Abstract).
- Speight, S.M., Harmon, D.L. and Tricarico, J.M. 2007. Application of carbohydrase inhibitors to moderate rumen fermentation: Continuous culture evaluation. *Journal of Dairy Science*. 90(Suppl. 1):340 (Abstract).
- Sprecher, D.J., Hostetler, D.E. and Kaneene, J.B. 1997. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriogenology*. 47:1179-1187.
- Stahl, D.A., Flesher, B., Mansfield, H.R. and Montgomery, L. 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*. 54:1079-1084.
- Stedman, T.L. 1982. *Stedman's Medical Dictionary*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA.
- Stern, M.D., Hoover, H., Sniffen, C.J., Crooker, B.A. and Knowlton, P.H. 1978. Effects of Nonstructural Carbohydrate, Urea and Soluble Protein Levels on Microbial Protein Synthesis in Continuous Culture of Rumen Contents. *Journal of Animal Science*. 47:944-956.
- Stevenson, D.M. and Weimer, P.J. 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75:165-174.
- Stewart, C.S., Flint, H.J. and Bryant, M.P. 1997. The rumen bacteria. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. P.10. P.N. Hobson and C.S. Stewart, eds. Chapman and Hall, London, UK.

- Stock, R.A., and Britton, R. 1993. Acidosis in feedlot cattle. In: Scientific update on Rumensin/Tylan for the professional feedlot consultant. Elanco Animal Health, Indianapolis, IN, USA.
- Stock, R.A., Laudert, S.B., Stroup, W.W., Larson, E.M., Parrott, J.C. and Britton, R.A. 1995. Effects of monensin and monensin and tylosin combinations on feed intake variation of feedlot steers. *Journal of Animal Science*. 73:39-44.
- Stone, W.C. 1999. The effect of subclinical rumen acidosis on milk components. P. 40-46. Proceedings Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, Cornell University, Ithaca, NY, USA.
- Sundset, M.A., Edwards, J.E., Cheng, Y.F., Senosiain, R.S., Fraile, M.N., Northwood, K.S., Præsteng, K.E., Glad, T., Mathiesen, S.D. and Wright, A-D. G. 2008. Molecular diversity of the rumen microbiome of Norwegian reindeer on natural summer pasture. *Microbial Ecology*. (Online)
- Sutton, J.D., Hart, I.C., Brosters, W.H., Elliot, R.J. and Schuller, E. 1986. Feeding frequency for lactating cows: effects on rumen fermentation and blood metabolites and hormones. *British Journal of nutrition*. 56:181-192.
- Sylvester, J.T., Karnati, S.K.R., Yu, Z., Morrisson M. and Frikins, J.L. 2004. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using Real-Time PCR. *The Journal of Nutrition*. 134:3378-3384.
- Sylvester, J.T., Karnati, S.K.R., Yu, Z., Newbold, C.J. and Frikins, J.L. 2005. Evaluation of a Real-Time PCR assay quantifying the ruminal pool size and duodenal flow of protozoal nitrogen. *Journal of Dairy Science*. 88:2083-2095.
- Tajima, K., Arai, S., Ogata, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Aminov, R.I. and Benno, Y. 2000. Rumen bacterial community transistion during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe*. 6:273-284.
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. and Benno, Y. 2001. Diet-sepdependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:2766-2774.

- Theander, O. 1991. Chemical analysis of lignocellulosic materials. *Animal Feed Science and Technology*. 32:35-44.
- Thill, L.A., Kocherginskaya, S.A., Naylor, G.E., Joblin, K.N. and White, B.A. 1997. Small subunit ribosomal RNA sequence analysis of anaerobic ruminal fungi isolated in New Zealand. P.28. *Proceedings of the 24th BIENNIAL Conference on Rumen Function*.
- Tokura, M., Chagan, I., Ushida, K. and Kojima, Y. 1999. Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. *Current Microbiology*. 39:123-128.
- Tung, R.S. and Kung, L. 1993. In vitro effects of a thiopeptide and monensin on ruminal fermentation of soluble carbohydrates. *Journal of Dairy Science*. 76:1083-1090.
- Van Soest, P.J. 1982. *Nutritional Ecology of the ruminant animal*. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74:3583-3597.
- Vedula, U., Schnitzer-Polokoff, R. and Tulp, O.L. 1991. The effect of acarbose on the food intake, weight gain, and adiposity of LA/N-cp rats. *Comparative biochemistry and physiology. A*. 100:477-482.
- Veira, D.M., Ivan, M. and Jui, P.Y. 1983. Rumen ciliate protozoa: effects on digestion in the stomach of sheep. *Journal of Dairy Science*. 66:1015-1022.
- Vicini, J.L., Bateman, H.G., Bhat, M.K., Clark, J.H., Erdman, R.A., Phipps, R.H., Van Amburgh, M.E., Hartnell, G.F., Hintz, R.L. and Hard, D.L. 2003. Effect of feeding supplemental fibrolytic enzymes or soluble sugars with malic acid on milk production, *Journal of Dairy Science*. 86:576-585.
- Vierstraete, A. 1999. <http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html> (Consultado en marzo de 2006).

- Waldrip, H.M. and Martin, S.A. 1993. Effects of an *Aspergillus oryzae* fermentation extract and other factors on lactate utilization by the ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii*. *Journal of Animal Science*. 71:2770-2776.
- Wallace, R.J., Arthaud, L. and Newbold, C.J. 1994. Influence of *Yucca schidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 60:1762-1767.
- Wallace, R.J., Wood, T.A., Rowe, A., Price, J., Yanez, D.R., Williams, S.P. and Newbold, C.J. 2006. Encapsulated fumaric acid as a means of decreasing ruminal methane emissions. *International Congress Series*. 1293:148-151.
- Wang, Y., McAllister, T.A., Cheeke, P.R. and Cheng, K.J. 1999. Assessment of inhibitory effects of ruminal fluid on biological activity of steroidal saponins using hemolytic assay. *Canadian Journal of Animal Science*. 79:561-564.
- Wang, Y., McAllister, T.A., Yanke, L.J. and Cheeke, P.R. 2000. Effect of steroidal saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes. *Journal of Applied Microbiology*. 88:887-896.
- Warner, A.C.I. 1962. Some factors influencing the rumen microbial population. *Journal of General Microbiology*. 28:129-146.
- Weimer, P.J., Stevenson, D.M., Mertens, D.R. and Thomas, E.E. 2008. Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80:135-145.
- Weinberg, Z.G., Chen, Y. and Gamburg, M. 2004. The passage of lactic acid bacteria from silage into rumen fluid, in vitro studies. *Journal of Dairy Science*. 87:3386-3397.
- Welch, R.P., Tsai, K.P., Harper, E.G., Chang, J.S. and Calza, R.E. 1996. The effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* EB 188: effects on physiology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 45:811-816.

- Wheeler, T.B., Wangsness, P.J., Muller, L.D. and Griel, L.C. 1980. Addition of sodium bicarbonate to complete pelleted diets fed to dairy calves. *Journal of Dairy Science*. 63:1855-1863.
- Whitford, M.F., Forster, R.J., Beard, C.E., Gong, J.H. and Teather, R.M. 1998. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe*. 4:153-163.
- Whitford, M.F., Teather, R.M. and Forster, R.J. 2001. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiology*. 1:5.
- Williams, A.G. 1986. Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiological Reviews*. 50:25-49.
- Williams, A.G. and Coleman, G.S. 1988. The rumen protozoa. In: *The rumen microbial ecosystem*. P. 77. P.N. Hobson, ed. Elsevier Applied Science, London, UK.
- Wiryawan, K.G. and Brooker, J.D. 1995. Probiotic control of lactate accumulation in acutely grain-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*. 8:1555-1568.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological reviews*. 51: 221-271.
- Wood, T.M., Wilson, C.A., McCrae, S.I. and Joblin, K.N. 1986. A highly active extracellular cellulase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbiology Letters*. 34:37-40.
- Wright, A.D., Dehority, B.A. and Lynn, D.H. 1997. Phylogeny of the rumen ciliates Entodinium, Epidinium and Polyplastron (Litostomatea:Entodiniomorpha) inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 44:61-7.
- Yanagita, K., Kamagata, Y., Kawaharasaki, M., Suzuki, T., Nakamura, Y. and Minato, H. 2000. Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of *Methanomicrobium mobile* by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 64:1737-1742.

- Yang, C.M.J. and Varga, G.A. 1989. Effect of three concentrate feeding frequencies on rumen protozoa, rumen digesta kinetics, and milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 72:950-957.
- Yokohama, M.T. and Johnson, K.A. 1988. Microbiology of the rumen and intestine. In: *The Ruminant Animal: Digestive physiology and nutrition*. P. 125-144. Ed. Church, D.C. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Yoon, I.K. and Stern, M.D. 1995. Influence of direct-fed microbials on ruminal microbial fermentation and performance of ruminants (A review). *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 8:533-555.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J. and Hwang, S. 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering*. 89:670-679.
- Zinn, R.A. 1991. Comparative feeding value of steam-flaked corn and sorghum in finishing diets supplemented with or without sodium bicarbonate. *Journal of Animal Science*. 69:905-916.